

Genexpressionsanalysen zum Studium der Hitzeschockantwort
von *Campylobacter jejuni* auf einen milden Temperaturstress

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch- Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Annekathrin Froeb-Borgwardt
geboren am 11.03.1975 in Bad Lobenstein

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dorn, Wolfram; FSU Jena
2. Prof. Dr. Dr. h.c. Fehlhaber, Karsten; Universität Leipzig
3. Prof. Dr. Kothe, Erika; FSU Jena

Tag der Disputation: 08.06.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Charakteristika von <i>Campylobacter</i> spp.	3
2.1.1	Morphologie	3
2.1.2	Klassifikation und Geschichte	3
2.1.3	Nachweis	4
2.2	Pathogenese der Campylobacteriose	4
2.2.1	Epidemiologie und Klinik von Campylobacteriosen	5
2.2.2	Risikogruppen	6
2.2.3	Virulenzfaktoren von <i>Campylobacter</i> spp.	7
2.3	Epidemiologie lebensmittelvermittelter Campylobacteriosen	8
2.3.1	Infektionswege von <i>Campylobacter</i> spp.	8
2.3.2	Assoziierte Lebensmittel	10
2.3.3	Lebensmittelhygiene	13
2.4	Stress und Reaktion des Mikroorganismus	15
2.4.1	Reaktion von <i>Campylobacter</i> spp. auf Stressoren in der Lebensmittelkette	17
2.4.2	Stressadaptation und Lebensmittelsicherheit	24
2.4.3	Interventionsmaßnahmen	25
3	Material und Methoden	28
3.1	Aufgabenstellung	28
3.2	Kultivierung der Stämme	28
3.2.1	Verwendete Stämme	29
3.2.2	Wachstumskurven	30
3.3	Temperaturen und Inkubationszeiten	31
3.3.1	Mikroarray	31
3.3.2	Quantitative PCR (Real-time PCR)	31
3.3.3	Mikroskopie	32
3.4	RNA Präparation	33
3.4.1	Extraktion	33
3.4.2	DNase-Verdau	33
3.4.3	Ethanolpräzipitation	34
3.4.4	Kontrolle der Gesamt-RNA	34

3.5	Herstellung der Targets	36
3.5.1	Reverse Transkription - Mikroarray	36
3.5.2	Reverse Transkription - quantitative PCR	37
3.6	Genexpressionsanalyse	38
3.6.1	Mikroarray	38
3.6.2	Quantitative PCR	41
4	Ergebnisse	47
4.1	Versuchsbedingungen	47
4.1.1	Wachstum	47
4.1.2	Test von Haushalts-Genen auf ihre Eignung	48
4.1.3	Effizienzanalyse der Real-time PCR	49
4.2	Untersuchung der Hitzeschockantwort auf physiologischer Ebene	50
4.2.1	Zellschäden infolge eines Hitzeschocks	50
4.2.2	Hitzestress und Keimzahlen	52
4.3	Untersuchung der Genexpression von <i>C. jejuni</i>	53
4.3.1	Auswertung der Mikroarray-Daten	53
4.3.2	Relative Quantifizierung der Expression von 11 Hitzeschockgenen mittels Real-time PCR	62
5	Diskussion	70
5.1	Die Adaptation an geänderte Temperaturen ist zeitlich reguliert	71
5.2	Analyse ausgewählter Hitzeschockgene von <i>C. jejuni</i> NCTC 11168	73
5.3	Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz	77
6	Zusammenfassung	82
7	Literaturverzeichnis	I-XIV
8	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

av	aviär
CCD-Kamera	Charge-Coupled Device-Kamera
CCUG	Culture Collection University of Göteborg
C_T	Schwellenwert
ΔC_T	Differenz der Schwellenwerte von Referenz- und Zielgen
$\Delta\Delta C_T$	relative Expressions-Ratio
Cy 3	Indocarbocyanin
Cy 5	Indodicarbocyanin
dATP	2-Desoxyadenosin-5-triphosphat
dCTP	2-Desoxycytidin-5-triphosphat
dGTP	2-Desoxyguanosin-5-triphosphat
dTTP	2-Desoxythymidin-5-triphosphat
dNTP	2-Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
cDNA	Komplementäre DNA
ds DNA	Doppelstrang DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GBS	Guillain –Barré –Syndrom
HCl	Salzsäure
HSP	Hitzeschockprotein
hum	human
IFSG	Infektionsschutzgesetz
KbE	Koloniebildende Einheiten
kb	Kilobasen, 1000 Nukleotide
kGy	Kilo-Gray (1Gy = 1 J/kg)
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
M	molar = g/mol
NaCl	Natriumchlorid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
rRNA	Ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA

mCCDA	modifizierter <i>Campylobacter</i> Selektiv-Agar, blutfrei
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid, Natriumsulfat-Lösung
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units = Einheiten
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Campylobacter (*C.*) spp. sind neben *Salmonella* (*S.*) spp. in Deutschland die bedeutendsten bakteriellen Erreger humaner Durchfallerkrankungen (RKI 2004). In einigen Industrieländern stehen die Campylobacteriosen bereits vor den gemeldeten Salmonellosen.

Humane *Campylobacter*-Infektionen treten hauptsächlich als Folge des Verzehrs kontaminierter Lebensmittel auf (SKELLY et al., 2003; KIST, 2002; Mead et al. 1999). Als Auslöser humaner Infektionen werden besonders kontaminiertes Geflügelfleisch und Wasser diskutiert. Trotz erster Interventionsmaßnahmen im Bereich der Primärproduktion steigt die Anzahl gemeldeter humaner *Campylobacter*-Infektionen weiterhin an (RKI, 2008). Obwohl der Mikroorganismus empfindlich auf verschiedenste Einflüsse reagiert, hat er Überlebensstrategien entwickelt, die bis dato weitestgehend ungeklärt sind.

Das ungenügende Erhitzen von Geflügelfleisch gilt, neben Kreuzkontaminationen, als Hauptursache für humane Campylobacteriosen. Sogenannte milde Stressoren, die den Mikroorganismus nicht letal schädigen, werden derzeit mit großem lebensmitteltechnologischem Interesse im Zusammenhang mit möglichen Adaptationsmechanismen von Mikroorganismen untersucht und diskutiert. Diese Adaptationsmechanismen spielen vermutlich eine entscheidende Rolle in der Überlebensstrategie von *C. jejuni* (DODD et al., 2007; JASSON et al., 2007; DATTA et al., 2003; MURPHY et al., 2003b). Eine detaillierte molekularebiologische Kenntnis über die Stressbewältigung und die damit verbundenen Regulationsmechanismen, derer sich der Organismus unter Stresseinwirkung bedient, ist daher notwendig, um entsprechende Interventionsstrategien zur Lebensmittelsicherheit zu entwickeln (LEISTNER, 2000; THURM et al., 1998).

In dieser Arbeit wird mit kulturellen und molekularebiologischen Methoden das Verhalten von *C. jejuni* unter subletalem Hitzestress untersucht. Die Anpassung des Mikroorganismus an Temperaturveränderungen spiegelt sich in der Konzentration an mRNA, die dem jeweiligen Protein entspricht, der Häufigkeit, mit der diese mRNA translatiert wird und die Stabilität des Proteins selbst wieder. Um das Verständnis über bakterielle Mechanismen der Stressantwort zu vertiefen, sollen zeitlich abgestufte Genexpressionsstudien durchgeführt werden. Zum einen soll anhand von Analysen des Kompletengenom-Mikroarray-Chips die globale Regulation der Stressantwort von *C. jejuni* unter einem milden Hitzestress, welcher seiner physiologischen Wachstumsgrenze entspricht, dargestellt werden. Im Zentrum stehen dabei die Adaptation und Regulation der Genexpression von *C. jejuni* während eines definierten Hitzestresses von 46 °C unter verschiedenen Inkubationszeiten.

Zum anderen soll die im Mikroarray-Experiment gemessene Induktion der Expression ausgewählter Gene, welche in den Auswertungen markante Expressionen zeigen, mit Hilfe einer relativen Quantifizierung durch die Real-time PCR verifiziert werden. Dabei soll nicht nur die Reaktion von *C. jejuni* vor und nach dem Hitzestress betrachtet werden, sondern verschiedene Zeit- und Temperaturabstufungen sollen Aufschluss über vermutete dynamische und stressabhängige Regulationsprozesse geben.

2 Schrifttum

2.1 Charakteristika von *Campylobacter* spp.

2.1.1 Morphologie

Es handelt sich bei *Campylobacter* (C.) um schlanke, spiralig gekrümmte, gramnegative, bewegliche, mikroaerophile Stäbchen, welche 0,2-0,5 µm dick und 0,5-5 µm lang sind (Abbildung 1). Die Einzelzellen können eine oder mehrere Windungen aufweisen. Sie zeigen an einem oder beiden Polen eine einzige Geißel.



Abbildung 1: *C. coli*, Elektronenmikroskopische Aufnahme (20.000fach vergrößert, Dr. F. Gaull, Institut für Lebensmittelhygiene, Leipzig)

2.1.2 Klassifikation und Geschichte

Erstmals wurde ein nicht kultivierbares, spiralförmiges Bakterium 1886 durch Theodor Escherich beobachtet und *Vibrio* genannt. 1957 wurde die Gattung mikroaerophiler Vibrionen als *Campylobacter* (campylos: griechisch-gebogener Stab) beschrieben (SEBALD et al., 1963).

Im Jahre 1972 wurden thermophile *Campylobacter* erstmals aus humanem Stuhl isoliert und die *Campylobacter*-Enteritis als „neue“ Erkrankung beschrieben (SKIRROW, 1977; DEKEYSER et al. 1972). In den Jahren 1981/82 kam es durch JONES et al. (1981) und

VOGT (1982) zu einer Beschreibung der Lebensmittelassoziation im Hinblick auf *Campylobacter*-Infektionen.

Anfang der 90iger Jahre wurde eine neue Einteilung geschaffen, nach der sich die Familie *Campylobacteraceae* in die beiden Gattungen *Campylobacter* und *Acrobacter* gliedert. Die Gattung *Campylobacter* beinhaltet 26 Spezies und 11 Subspezies (Euzéby, 2008). Zu den thermophilen Vertretern gehören *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* (VANDAMME et al., 1992).

2.1.3 Nachweis

Die Empfindlichkeit des Erregers (z.B. gegenüber Austrocknung, Wärme und Sauerstoff) erschwert häufig den Nachweis des direkten Zusammenhangs zwischen *Campylobacter* in Lebensmitteln und der menschlichen Erkrankung (THURM et al., 1998). Weiterhin sind Rückstellproben ausgegebener Speisen oftmals nicht mehr vorhanden. DNA-Fingerprinting Methoden erwiesen sich hilfreich bei der Aufklärung von Lebensmittelinfektionen, wobei in Einzeluntersuchungen lückenlos die klonale Indizienkette durch THURM und DINGER (1998) von den Tierbeständen bis zu den Erkrankten dargestellt werden konnte.

Während in der klinischen Mikrobiologie die PCR mehr Einsatzmöglichkeiten zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen gewinnt, ist ein flächendeckender Einsatz in der Lebensmittelanalytik bisher nicht gegeben (WAGNER, 2001). Jedoch sind erfolgversprechende Ansätze erkennbar, die molekularbiologische Verfahren zur Unterstützung von mikrobiologischen Untersuchungsverfahren in Zukunft führen können.

2.2 Pathogenese der Campylobacteriose

Die Pathogenese einer *C. jejuni*-Infektion involviert wirts- und bakterienspezifische Faktoren. So beeinflussen der Gesundheitszustand, das Alter des Wirtes und seine eventuell erworbene humorale Immunität durch vorausgegangene Kontakte den klinischen Verlauf nach der Infektion (ALTEKRUSE et al., 1999).

Die allgemeine Häufigkeit von *Campylobacter*-Infektionen ist bedingt durch eine weite speziesübergreifende Verbreitung des Bakteriums in der Tierwelt, vor allem bei Nutztieren, und das nahezu ubiquitäre Vorkommen in der Umwelt. Sie kolonisieren als normale Besiedler des Darmes ein weites Spektrum von Wild- und Haustieren ohne klinische Symptome auszulösen (KIST, 2002; VAN VLIET et al., 2001). Die Ausscheidung einer hohen Zahl von *Campylobacter* spp. über die Faeces ist eine signifikante Überlebensstrategie (JONES, 2001).

2.2.1 Epidemiologie und Klinik von Campylobacteriosen

Etwa 80 bis 95 % der humanen Erkrankungen werden durch *C. jejuni* verursacht, *C. coli* steht an zweiter Stelle, *C. lari* und *C. fetus* werden wesentlich seltener als Erreger identifiziert (GILLESPIE et al., 2002; HARTUNG, 2001). Die Inzidenzrate weist jahreszeitlich und regional bedingte Unterschiede auf und liegt im Bundesdurchschnitt bei ca. 70 pro 100.000 Einwohner.

Hauptsymptome einer humanen Campylobacterenteritis zeigen sich nach einer Inkubationszeit von 2 bis 7 Tagen in Form von akutem Durchfall. Dieser ist häufig mit Blut vermischt und von Fieber begleitet (VAN VLIET et al., 2001; THURM et al., 1998). In der Regel klingt die Erkrankung nach 5 bis 8 Tagen ab (VAN VLIET et al., 2001). Die Ausscheidung des Erregers dauert etwa drei Wochen. Bei immunsupprimierten Patienten kann es zu einer Langzeitausscheidung kommen (KIST, 2002). Die minimale Infektionsdosis mit ca. 500-800 Erregern ist niedrig (THURM et al., 1998). Komplikationen nach einer *Campylobacter*-Infektion sind selten, jedoch wegen ihrer Assoziation mit neurologischen Funktionsstörungen pathologisch bedeutungsvoll (VAN VLIET et al., 2001).

Mögliche Folgeerkrankungen einer *Campylobacter*-Infektion können eine reaktive Arthritis und das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) sein (KIST, 2002). Die reaktive Arthritis wird in weniger als 1 % der Enteritis-Fälle beobachtet. Das GBS ist eine seltene Folgeerkrankung der *Campylobacter*-Enteritis, hat jedoch wegen seines potenziell lebensbedrohlichen Verlaufs und möglicher Spätfolgen große medizinische Bedeutung (KIST, 2002). Das GBS ist eine autoimmune Funktionsstörung des peripheren Nervensystems mit teilweise irreversiblen neurologischen Schäden (NACHAMKIN et al., 1998). Durch die Zerstörung der peripheren Nervenfasern sind die oberen Extremitäten und die Hirnnerven in wechselnder Intensität betroffen, wobei sich kurzfristig eine respiratorische Insuffizienz mit Beatmungspflicht entwickeln kann (KIST, 2002). In den Industrieländern konnte die Mortalitätsrate von GBS-Patienten auf 2 bis 3 % gesenkt werden, in den Entwicklungsländern liegt sie weitaus höher (NACHAMKIN et al., 1998). In einer Studie fassen NACHAMKIN et al. (1998) Daten aus den USA und China zusammen, aus denen hervorgeht, dass bei 36 % der an GBS erkrankten Patienten *Campylobacter* nachgewiesen werden konnten.

Ab dem Jahr 2001 liegen erstmals verbindliche Meldezahlen für *Campylobacter*-Infektionen in Deutschland durch die Einführung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) vor. Nach §7 IfSG ist der Nachweis darmpathogener *Campylobacter*-Spezies meldepflichtig, sofern eine akute Infektion anzunehmen ist. Auf europäischer Ebene regelt unter anderem die Zoonosen-Überwachungsrichtlinie 2003/99/EG die Überwachung bzw. die Kontrolle von *Campylobacter* spp. im Bereich der Veterinärmedizin bzw. der Landwirtschaft (ALPERS et al., 2004).

So zeigt die Statistik in Abbildung 2 *Campylobacter* neben den Salmonellen als einen der bedeutendsten Erreger von Durchfallerkrankungen in Deutschland. In einigen Industrieländern (z.B. England, USA, Niederlande, Schweden, Irland, Schweiz und in den letzten Jahren auch in Deutschland) hat die Anzahl der gemeldeten *Campylobacter*-Infektionen bereits die Zahl gemeldeter Salmonellose überschritten (ANONYMOUS, 2003; GORMAN et al., 2002; KIST, 2002).

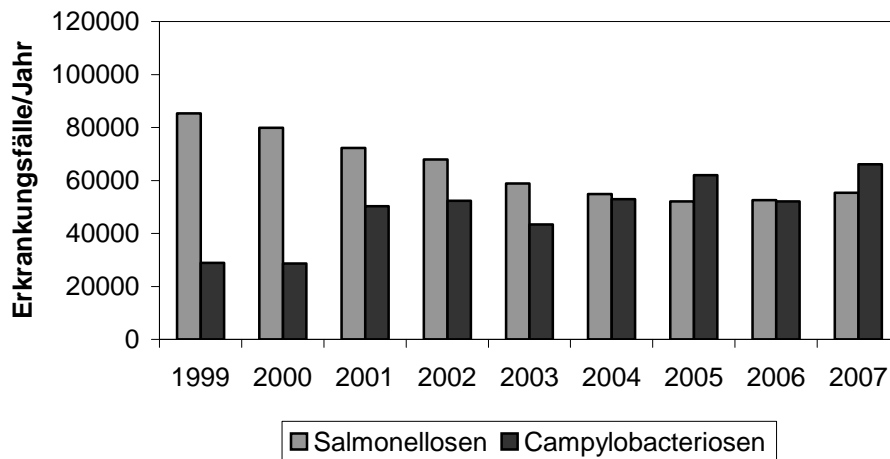


Abbildung 2: Erkrankungszahlen in Deutschland an Salmonellosen und Campylobacteriosen (RKI, 2008)

Der deutliche Anstieg von Campylobacteriosen ist teilweise auf eine intensivere Erfassung und Verbesserung der Diagnostik zurückzuführen (HARTUNG, 2001). Trotzdem wird die Überwachung lebensmittelbedingter Erkrankungen weiterhin erschwert durch Fehldiagnosen, durch Schwierigkeiten, die Infektkette lückenlos zu schließen, beziehungsweise durch Nichterkennen einer Lebensmittelinfektion. Dieser Faktor ist nach MEAD et al. (1999) nicht zu unterschätzen, da viele pathogene Lebensmittelinfektionserreger nicht als Grund einer Erkrankung identifiziert werden.

2.2.2 Risikogruppen

Der Anteil der Gruppen in der Bevölkerung, die für eine lebensmittelbedingte Enteritis empfänglich sind, hat in den letzten Jahren zugenommen (AMMMON et al., 2002). Die Risikogruppe umfasst die sogenannten „YOPIs“ (Young, Old, Pregnant and Immuno-compromised Persons: Kinder, alte Menschen, Schwangere und Menschen mit einem geschwächten Immunsystem). Es ist nach AMMON und BRÄUNING (2002) davon auszugehen, dass inzwischen 20 % der Bevölkerung in Deutschland zu dem Personenkreis sogenannter Risikogruppen zu zählen sind.

Unabhängig vom Immunstatus beschreiben ROSENQUIST et al. (2003) eine weitere Risikogruppe: die Population von Personen im Alter von 18-29 Jahren zeigt hohe Inzidenzraten, was – so spekulieren die Autoren- auf eine unzureichende Praxis im Umgang mit Lebensmitteln zurückgeführt werden könnte.

2.2.3 Virulenzfaktoren von *Campylobacter* spp.

Die Mechanismen, mit welchen *Campylobacter* eine Erkrankung hervorrufen, sind noch nicht vollständig geklärt. Die Sequenzierung des Genoms von *C. jejuni* hat zu einigen wesentlichen Fortschritten im Verständnis der Pathogenitätsfaktoren des Erregers beigetragen (VAN VLIET et al., 2001). Als relevante Virulenzfaktoren des Erregers haben sich die chemotaktisch gesteuerte Motilität, die Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion, die Bildung von Toxinen, die Variabilität der Oberflächenantigene sowie die Verarbeitung von Umweltstressfaktoren herauskristallisiert (KIST, 2002; VAN VLIET et al., 2001; WASSENAAR, 1997).

Durch die Beweglichkeit mittels monopolarer Geißeln, kombiniert mit der spiralen Form des Bakteriums, überwindet *Campylobacter* effizient die visköse Schleimbarriere im Intestinum (MARCHANT et al., 2002; VAN VLIET et al., 2001). *C. jejuni* haftet an den Epithelzellen an, anschließend dringt eine Subpopulation in die Zellen ein. Dies führt oft zu Entzündungen der Darmschleimhaut (VAN VLIET et al., 2001). Bei *C. jejuni* sind mehrere Cytotoxine und Enterotoxine beschrieben worden. Ihr Aktionsmechanismus und ihre Bedeutung scheinen weiterhin unklar (WASSENAAR, 1997). Nur die Bedeutung des Cytolethal Distending Toxins (CDT) konnte molekulargenetisch verifiziert werden. Es führt zum Auftreiben und schließlich zum Absterben der Zelle (WASSENAAR, 1997). Die Expression von Virulenzgenen ist von vielen Parametern abhängig, wie z.B. von der Osmolarität, dem pH-Wert, der Eisenkonzentration und der Temperatur (KONKEL et al., 2000).

2.3 Epidemiologie lebensmittelvermittelter *Campylobacteriosen*

2.3.1 Infektionswege von *Campylobacter* spp.

Die fehlende Vermehrungsmöglichkeit von *Campylobacter* in der Umwelt wird durch eine massive Vermehrung in zahlreichen Wirten ausgeglichen, die ihrerseits große Keimzahlen in die Umwelt freisetzen. Vorrangig bringen kontaminierte tierische Lebensmittel (vor allem Rohmilch und Geflügelfleisch) den Lebensmittelinfektionserreger in die Nahrungsmittelkette des Menschen ein, aber auch kontaminierte Oberflächengewässer sowie der Kontakt mit Haustieren (v.a. Hunde, Katzen) kann zum Auftreten sporadischer *Campylobacter*-Infektionen beim Menschen führen (KAPPERUD et al., 2003; HALD et al., 1997; ADAK et al., 1995).

Abbildung 3 zeigt mögliche Infektions- und Kontaminationswege von *C. jejuni*. Generell können drei Übertragungsmechanismen des Erregers formuliert werden:

- a) eine direkte Übertragung durch Faeces,
- b) eine Kontamination während der Lebensmittelherstellung und Zubereitung (einschließlich Tiernahrung und Futter),
- c) der Eintrag und die Übertragung innerhalb des aquatischen Bereiches (SKELLY et al., 2003).

Da sich *C. jejuni* vorrangig im Intestinaltrakt von Tieren vermehrt, ist eine Exkretion des Erregers über die Faeces von Tieren die Hauptursache nachfolgender Infektionen (SKELLY et al., 2003). Der Mikroorganismus zeigt dabei eine hohe Prävalenz in Geflügelbeständen (ATANASSOVA et al., 1999). Viele Untersuchungen belegen, dass die horizontale Übertragung von *Campylobacter* der hauptsächlichste Übertragungsweg ist (SAHIN et al., 2002). Aber auch vertikale Übertragungen im Geflügelbereich werden vereinzelt beschrieben (SAHIN et al., 2002).

Epidemiologische Studien gehen davon aus, dass der direkte Kontakt mit Tieren nicht die Hauptursache humaner *Campylobacteriosen* ist, denn vergleichsweise wenig Menschen industrialisierter Länder kommen mit tierischem Faeces in Kontakt (SKELLY et al., 2003). Beschäftigte, welche in der Landwirtschaft oder in Schlachthöfen beschäftigt sind, erwerben jedoch meist eine Immunität gegenüber *Campylobacter* (CAWTHRAW et al., 2000). Kontaktinfektionen spielen nur bei Kindern eine Rolle (THURM et al., 1998). Dabei stellen durchfallerkrankte Welpen und junge Katzen eine Infektionsquelle dar (NEIMANN et al., 2003). Die *Campylobacteriose* des Menschen ist vorzugsweise eine lebensmittelassoziierte Erkrankung.

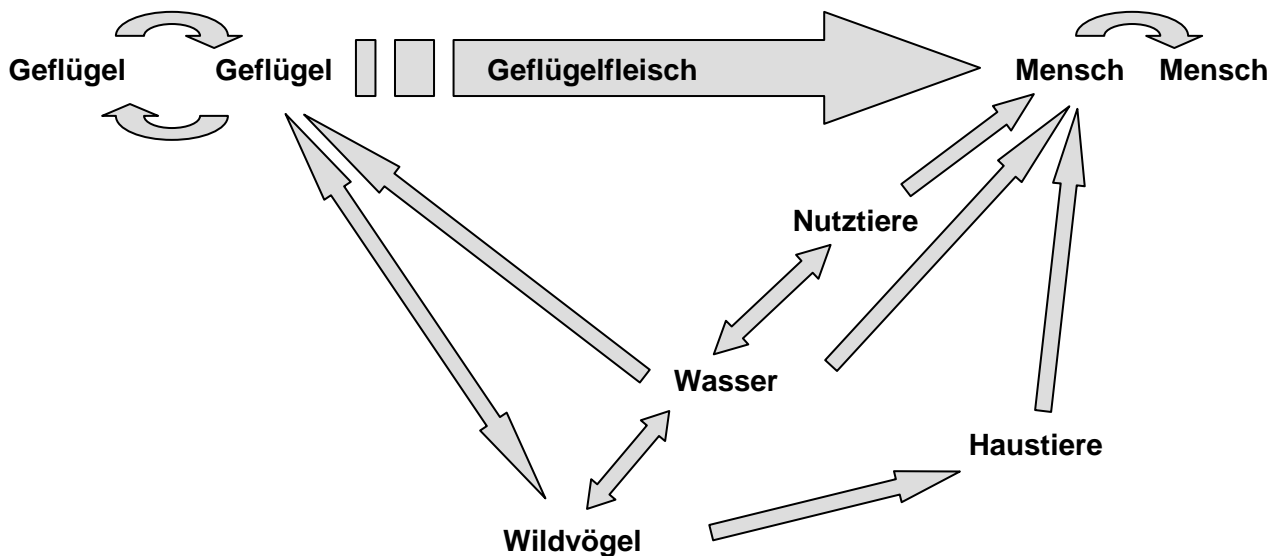


Abbildung 3: Infektionswege von *C. jejuni*, modifiziert nach Friedman et al. (2000)

Der Eintrag der Faeces von Wildvögeln und Nagetieren spielt eine entscheidende Rolle in der Kontamination von Tierfutter und/oder Wasser. Eine Studie von NICHOLSON et al. (2005) zeigte, dass *Campylobacter* nicht nur 3 Monate in Schlamm und fäkal kontaminiertem Wasser überleben konnte, sondern auch nach Applikation auf Sand- und Lehmböden einen weiteren Monat nachzuweisen war.

Weiterhin spielt Wasser in der Exposition mit *Campylobacter* spp. eine zentrale Rolle. Durch die vielseitige Verbreitung von *Campylobacter* spp. in der Tierwelt ist mit einem hohen Kontaminationsrisiko zu rechnen, besonders in Wasserläufen unterhalb des Einzugsbereiches landwirtschaftlicher Betriebe oder auf Weideflächen. Dabei sind *Campylobacter* spp. in Seen und Flüssen bei kühlen Temperaturen regelmäßig in hohen Keimzahlen zu finden. Bei höheren Temperaturen und verstärkter UV-Einstrahlung sind geringere Keimzahlen nachweisbar (JONES, 2001). Es treten besonders hohe Keimzahlbelastungen in Zierteichen und anderen Gewässern auf, welche oft von Wassergeflügel aufgesucht werden (JONES, 2001). Untersuchungen von Oberflächengewässern weisen das Vorkommen thermophiler *Campylobacter* spp. zu 22,7 % bis 44,7 % nach. Dabei waren Flüsse etwa doppelt so häufig mit thermophilen *Campylobacter* kontaminiert als Seen. Knapp 60 % der Isolate wurden als *C. jejuni*, 25,8 % als *C. coli* und 6,5 % als *C. lari* differenziert (SCHINDLER et al., 2003).

2.3.2 Assoziierte Lebensmittel

Ca. 80 % aller *Campylobacter*-Infektionen sind lebensmittelassoziiert (MEAD et al., 1999). In diesem Zusammenhang sind Geflügelfleisch und Geflügelleber, kontaminiertes Wasser und Rohmilch als assoziierende Lebensmittel zu nennen. Die erhobenen Daten von Hartung (2007) leiten einen Zusammenhang verzehrter Lebensmittel und humaner *Campylobacter*-Infektionen in Form einer Trendanalyse ab. Dabei zeigte sich die höchste Korrelation (85%) mit Geflügelfleisch. Zusammengefasst wurden 57,6 % Lebensmittel (einschließlich Rohmilch) und 15 % Wasser als Ursache für *Campylobacter*-Ausbrüchen in den Ländern der Europäischen Union beurteilt (HARTUNG, 2001).

Rohmilch

Durch Kotverschmutzung kann es zur Kontamination der Milch beim Melken kommen. Ohne Temperierung kann diese als Rohmilch eine wichtige Infektionsquelle für den Menschen darstellen, ungeachtet der Tatsache, dass im Gegensatz zu den Salmonellen keine nachträgliche Vermehrung stattfindet. Belege hierfür sind Gruppenerkrankungen durch *C. jejuni* nach Verzehr von Rohmilchprodukten. Die klonale Identität der nachgewiesenen *C. jejuni*-Stämme konnte dabei bei Erkrankten und den Erreger ausscheidenden Kühen mittels Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE) nachgewiesen werden (RKI, 2000).

Milchassoziierte *Campylobacter*-Infektionen lassen sich durch die Pasteurisierung der Milch oder Abkochen sicher verhindern.

Wasser

Kontaminiertes Wasser bzw. unbehandeltes Trinkwasser werden zunehmend als Ursache sporadischer *Campylobacter*-Infektionen diskutiert (GUILLOU et al., 2008; SKELLY et al., 2003; THOMAS et al., 1999; ADAK et al., 1995). Berichte über trinkwasserbedingte Campylobacteriosen sind bisher selten publiziert. Der Nachweis gestaltet sich schwierig, da Beobachtungen zufolge *Campylobacter* spp. im Wasser in den VBNC-Status (Viable-but-non culturable = lebensfähig, nicht kultivierbar: VBNC) übergehen und somit nicht kultivierbar sind (GUILLOU et al., 2008; TATCHOU-NYAMSI-KONIG et al., 2007; THOMAS et al., 2002). Jedoch deuten in Finnland und Schweden gewonnene Daten trinkwasserassoziierten Campylobacteriose-Ausbrüchen auf ein nicht zu unterschätzendes Risiko hin (MARTIN et al., 2006; KUUSI et al., 2005). Das Risiko, an einer Gastroenteritis nach dem Trinken kommunalen Trinkwassers zu erkranken, war in einer Kohortenstudie gegenüber der

Vergleichsgruppe um das 2,3fache erhöht. *Campylobacter* und *E. coli* wurden in kommunalen Trinkwasserproben nachgewiesen (MARTIN et al., 2006). Ein Erklärungsansatz für solch eine Trinkwasserkontamination liefern mikrobiologische Untersuchungen, welche in Österreich auf eine fäkale Kontamination des unbehandelten Trinkwassers durch Einschwämmung von Fäkalkeimen (u.a. *Campylobacter*) durch ungewöhnlich starke Regenfälle hinweisen (MEUSBURGER et al., 2007). Dass in Flaschen abgefülltes Mineralwasser ebenfalls ein Risiko, an einer Campylobacteriose zu erkranken, darstellen soll, wurde nur von EVANS et al. (2003) in einer Kohortenstudie beschrieben, experimentelle Nachweise gibt es bisher dafür nicht (BANG et al., 2003).

Geflügelfleisch

Studien belegen, dass der Verzehr von unzureichend gegartem Hühnerfleisch bzw. dessen Behandlung bei der Zubereitung im Haushalt zu den größten Risikofaktoren humaner *Campylobacter*-Infektionen gehören. Quantitative Risikoschätzungen zeigen, dass etwa 47 % der in Deutschland aufgetretenen Campylobacteriosefälle auf Hähnchenfleisch zurückgeführt werden können. Hierfür spricht auch die hohe Nachweisrate (fast 60 %) von *Campylobacter* spp. bei Hähnchenfleisch aus dem Einzelhandel (BFR, 2006). Das Wachstum der thermophilen Vertreter ist optimal an die Körpertemperatur von Vögeln adaptiert. Epidemiologische Studien zeigen Prävalenzen von *Campylobacter* in Hühnern, Puten und Enten von 40 % bis 100 % (DICKINS et al., 2002). Die Tiere zeigen meist keine klinischen Symptome einer Infektion.

Die Kontrolle der *Campylobacter*-Infektionen wird erschwert durch eine schnelle Ausbreitung bei Schlachtgeflügel während der Haltung, des Transportes und des Schlachtprozesses. Meist wird das Geflügel im Alter zwischen wenigen Tagen und sechs Wochen mit *Campylobacter* besiedelt. Primäre Infektionsquellen sind dabei vor allem das Tränkwasser, Nagetiere, Insekten und Wildvögel (CORY et al., 2001). Eine Studie in England zeigte, dass nach vier Wochen 40 % und nach sieben Wochen über 90 % der Herden mit *Campylobacter* infiziert waren (EVANS et al., 2000). Die quantitative Belastung von Geflügelfaeces beträgt nach YANG et al. (2001) und ZHAO (2003) 10^2 bis $>10^7$ KbE/g Faeces. In den 90er-Jahren betrug die Kontaminationsrate bei frischem Hähnchenfleisch in den USA, den Niederlanden, in England und Wales zwischen 80 % und 90 %. In Schweden Finnland und Norwegen wurden geringere Prävalenzen gefunden (CORY et al., 2001).

Untersuchungen von HEUER et al. (2001) zeigten, dass Geflügelbestände aus konventioneller Haltung am seltensten (36 %), dagegen Bestände in ökologischer Freilandhaltung am häufigsten (100 %) infiziert waren. In extensiver Bodenhaltung aufgezogene Herden nahmen eine Mittelstellung (49,2 %) ein.

Campylobacter spp. werden nach der Schlachtung hauptsächlich auf der Geflügelhaut und in den Körperhöhlen gefunden. Aber auch Innereien, wie die Leber, das Herz und der Magen, können mit *Campylobacter* kontaminiert sein (ATANASSOVA et al., 1999). Bei einer amerikanischen Untersuchung von Geflügelfleisch waren 70,7 % des verkaufsfertigen Hähnchenfleisches kontaminiert, während bei Truthahnfleisch in 14 %, in Schweinefleisch in 1,7 % und bei Rindfleisch in 0,5 % der Proben *Campylobacter* nachgewiesen wurde (ZHAO et al., 2001). HUMPHREY (2001) wies nach, dass 80 bis 90 % des Geflügelfleisches im Verkauf in den Niederlanden, Italien, Deutschland und England *Campylobacter* belastet war, gefolgt von kontaminiertem Lammfleisch (72,9 %), Schweinefleisch (71,7 %) und Rinderleber (49,0 %) (KRAMER et al., 2000). Dabei dominiert *C. jejuni* bei Geflügel (77,3 %), Kalb (75,0 %) und Rinderleber (54,2 %). *C. coli* ist mit 42,4 % die dominierende Spezies in Schweineleber.

Eine Fall-Kontroll-Studie stellt Hühnerleber als bedeutendstes Risikoprodukt für den Konsumenten heraus. Dabei waren die Kontaminationen größtenteils nicht oder nicht nur oberflächlicher Natur (ANONYMOUS, 2001; BAUMGARTNER et al., 1995). In der Gastronomie ist es üblich, Geflügelleber nur kurz zu braten.

Verbraucherkenntnis über lebensmittelassoziierte Bakterien

Humane Infektionen mit *Campylobacter* spp. sind weltweit verbreitet. Heute ist die Campylobacteriose eine der häufigsten Zoonosen. In der Bevölkerung sind diese Mikroorganismen jedoch kaum bekannt. So zeigt eine Konsumentenbefragung aus den USA, dass nur sehr wenige Verbraucher schon etwas von *Campylobacter*-assoziierten Erkrankungen durch Lebensmittel gehört hatten (Abbildung 4). Aus Befragungen von Konsumenten ging hervor, dass vielfach durch Verbraucher und Wissenschaft eine unterschiedliche Wahrnehmung von Risiken lebensmittelassoziiierter Erkrankungen erfolgt und bedeutende Lebensmittelinfektionserreger wie *Listerien* und *Campylobacter* unter Konsumenten oftmals nicht bekannt sind (AMMMON et al., 2002). Für den Verbraucher ist deshalb eine informative, sachliche und umfassende Aufklärung notwendig, wenn auch allgemeine Verbraucherinformationen zur Küchenhygiene in privaten Haushalten vergleichsweise geringe Beachtung erfahren. Der Arbeitsbericht der ARBEITSGRUPPE LEBENSMITTELQUALITÄT UND -SICHERHEIT (2002) hebt als einen wichtigen Ansatzpunkt des Verbraucherschutzes die Weiterentwicklung der Verbraucherbildung an Schulen. Dies bietet Chancen, Menschen in einer relativ frühen Entwicklungsphase zu erreichen, in welcher Verhaltensweisen noch nicht habitualisiert sind.

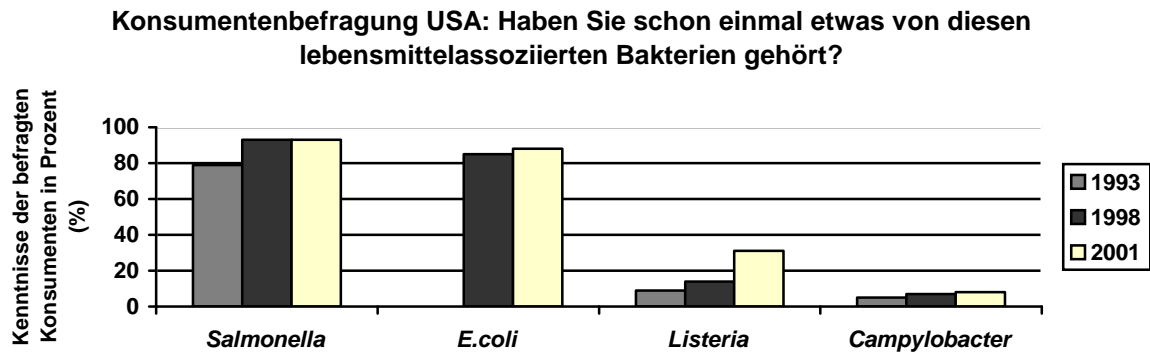


Abbildung 4: Konsumentenbefragung durch CATES (2002)

2.3.3 Lebensmittelhygiene

Die Tierhaltung, die Schlachtung und die Lebensmittelverarbeitung bergen eine Vielzahl von Faktoren der Kreuzkontamination. Die Erzeugung *Campylobacter* spp.-freier Lebensmittel ist derzeit nicht zu gewährleisten. Deshalb stellt die Lebensmittelverarbeitung eine entscheidende Hürde für ein Überleben von *Campylobacter* spp. im Lebensmittel dar. Dabei ist nicht nur das Erreichen einer Kerntemperatur von 70 °C im Lebensmittel notwendig, sondern auch die Einhaltung einer konsequenten Küchenhygiene zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen, bei denen *Campylobacter* spp. von einem Lebensmittel auf ein ursprünglich einwandfreies Lebensmittel übertragen werden können.

Des Weiteren spielen Verbrauchertrends und Lebensmittelkenntnis eine wichtige Rolle. So fördert der Trend zu naturbelassenen Produkten (beispielsweise Rohmilchprodukten) den Verzehr roher Lebensmittel (THURM et al., 1998). Mit der Rohware können *Campylobacter* spp. in die Küchen gelangen. Bei Vernachlässigung hygienischer Grundregeln kann es zu einer mikrobiellen Verunreinigung anderer Lebensmittel kommen, nicht ausreichendes Erhitzen kann zum Entstehen einer Campylobacteriose beitragen.

Schlachthygiene

Der Schlachtprozess mit seinen verschiedenen technologischen Punkten führt einerseits zu einer deutlichen Verminderung der Keimbelastung von Geflügelfleisch mit *C. jejuni*, jedoch kann es auch andererseits zu einer weiteren Verbreitung durch Kreuzkontamination kommen. In Abbildung 5 beschreiben ALTER et al. (2002) die Verteilung von *C. jejuni*-Stämmen auf Putenschlachtkörpern an verschiedenen Punkten der Schlachtlinie.

Der Schlachtvorgang und die Verarbeitung der Schlachtkörper tragen nachweislich zur Übertragung von *Campylobacter* bei. Die Kontamination erfolgt entweder durch intestinale Bestandteile oder direkt von Tier zu Tier durch Wasser bzw. Gerätschaften (CORRY et al., 2001). Eine erhebliche Kontaminationsquelle im Schlachthof und auf den Farmen ist das Personal. Strikt eingehaltene Personalhygienemaßnahmen wie u.a. das Wechseln der Schuhe, Schuhdesinfektion und das regelmäßige Desinfizieren von Händen reduzieren nachweislich das Risiko einer *Campylobacter*-Kontamination (VAN DE GIESSEN et al., 1998).

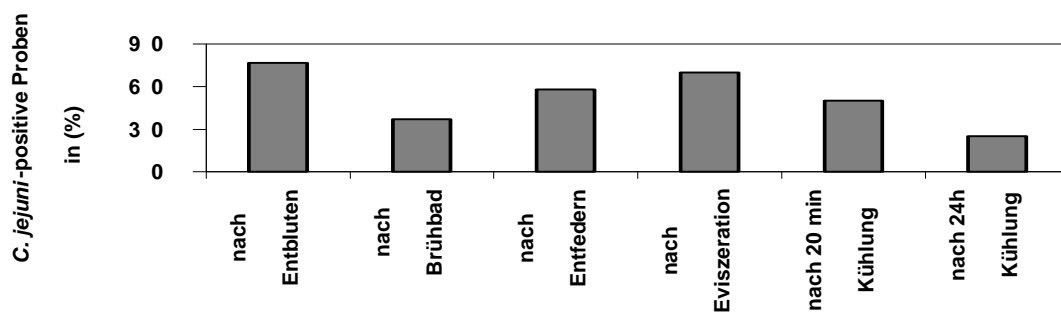


Abbildung 5: Verteilung von *C. jejuni*-Stämmen auf Putenschlachtkörpern an verschiedenen Punkten der Schlachtlinie (ALTER et al., 2002)

Küchenhygiene

Bereits das Auspacken von Geflügel kann *Campylobacter*-haltige Aerosole erzeugen, die dieses Bakterium verbreiten. HUMPHREY (2001) fand *Campylobacter* an der äußeren Verpackung von Geflügelfleisch und wies ihn schließlich auch an verschiedenen Stellen in der Küche nach. In einer Studie von COGAN et al. (1999) wurden Studenten Hühnerfleisch aus dem Supermarkt zusammen mit Gemüse zur Zubereitung gegeben. *Campylobacter* spp. konnten sowohl von den Händen der Studenten, vom Messer, dem Wasserhahn, dem Schneidebrett und der Kleidung isoliert werden. Wie schnell es zu einer Kreuzkontamination von *C. jejuni* von einer kontaminierten Arbeitsplatte auf ein Lebensmittel kommen kann, zeigt ein Experiment von KUSUMANINGRUM et al. (2003). Die Transferrate von *C. jejuni* auf das Lebensmittel betrug 50 bis 100 % auf Gurkenscheiben und 25 bis 100 % auf gegrillte Hühnerfilets.

MATTICK et al. (2003) gelang es, *Campylobacter* von einem Geschirrtuch zu isolieren, welches während der Zubereitung von Geflügelfleisch und Salat benutzt wurde.

Eine entscheidende Rolle spielt die Wassertemperatur und die Nutzung von Detergenzien beim Abwaschen von genutzten Küchenutensilien. *Campylobacter* sind aus

Abwaschwasserproben isoliert worden, überlebten dort 12 min bei 38 °C bis 48 °C und konnten unter experimentellen Bedingungen auf Geschirr übertragen werden (MATTICK et al., 2003; HUMPHREY, 2001). Oftmals ist das Abwaschwasser nicht heiß genug und es besteht die Gefahr des Verschmierens oder Verteilens des Keimes mit dem Lappen auf den Küchenoberflächen. Unter Beachtung der Hitzetoleranz (50 °C) des Erregers kommt MATTICK et al. (2003) zu dem Schluss, dass eine durchschnittliche Wassertemperatur beim Abwaschen von durchschnittlich 40,9 °C zu niedrig ist, um *Campylobacter* abzutöten.

Eine internationale Studie von REDMOND und GRIFFITH (2003) ermittelt den Ursprung von 10 bis 40 % aller lebensmittelbedingten Erkrankungen in privaten Haushalten (Deutschland: 36 %). Dieser hohe Anteil deutet auf ein verändertes Verbraucherverhalten hin. Immer mehr Mahlzeiten werden außer Haus eingenommen. Dies bedeutet, dass Verbraucher weniger Zeit auf die Nahrungsmittelzubereitung verwenden und nur noch mangelnde Kenntnisse über den richtigen Umgang mit Lebensmitteln und Küchenhygiene haben.

Zur intensiven Kontamination von Lebensmitteln tragen das industrielle oder gewerbliche Ausnehmen, das Hantieren mit unverpacktem Frischgeflügel beim Zerlegen auf Märkten und die küchentechnische Zubereitung bei. Risikoreich gestalten sich Kreuzkontaminationen zwischen rohem und zubereitetem Geflügelfleisch, wie sie in Großküchen vorkommen können, wenn Arbeitsvorbereitung und Fertigproduktlagerung nicht strikt getrennt oder nicht von unterschiedlichem Personal betrieben werden. Hierbei kann es zu einer intensiven Kontamination der Hände bei den Arbeitskräften, die rohes Geflügel in aufgetautem oder gekühltem Zustand behandeln und zerlegen, kommen (BEUTLING, 1998). Somit stellt die Verarbeitung von Geflügelfleisch eine hohe lebensmittelhygienische Anforderung an die Verarbeitungsbetriebe.

2.4 Stress und Reaktion des Mikroorganismus

Campylobacter reagiert, wie alle Organismen und Mikroorganismen, unter Stress. Dabei wird der Begriff „Stress“ in dieser Arbeit als ein Faktor oder eine Kondition verstanden, welche sich unmittelbar auf das mikrobielle Wachstum und/oder das Überleben auswirkt. Die Fähigkeit des Organismus, schnell auf sich ändernde Umgebungsbedingungen zu reagieren, ist essentieller Bestandteil seiner Pathogenität und Tenazität. Dieses Reaktionsvermögen baut auf dem Vorhandensein von Mechanismen der Umweltdetektion und entsprechender physiologischer Einstellungen auf (PARK, 2002). Alle Reaktionen auf Stress beinhalten eine Serie genetischer Reaktionen, welche dazu dienen, den Zellmetabolismus aufrechtzuerhalten und zu kontrollieren (ABEE et al., 1999).

Campylobacter sind als pathogene Lebensmittelinfektionserreger in ihrer Umwelt und im Lebensmittel physikalischen (z.B. Hitze, Kälte, osmotischen Differenzen), chemischen (z.B. Säure, Salz, Oxidation) und biologischen Stresssituationen (z.B. Antagonisten) ausgesetzt (YOUSEF und COURTNEY, 2003). Um im Gastrointestinaltrakt eines Wirtes kolonisieren zu können, muss *Campylobacter* erfolgreich verschiedene Umgebungsbedingungen tolerieren und in einer dynamischen Umwelt um Nährstoffe konkurrieren (PARK, 2000).

Mikroorganismen haben Signal-Transduktions-Systeme entwickelt, welche auf Umweltstress reagieren und die Koordination der Genexpression kontrollieren (PARK, 2002). Die Kenntnis der Genomsequenz von *C. jejuni* erlaubt nun der Wissenschaft, die Stressantwort auf mRNA-Ebene zu beobachten (PARKHILL et al., 2000). Studien beschreiben intrazelluläre Prozesse, wie die Transkription und die Translation, und extrazelluläre Signalmechanismen, welche das Überleben der Bakterienzelle in Stresssituationen sichern (MURPHY et al., 2003b; BOOTH, 2002).

Intrazelluläre Regulationsprozesse

C. jejuni besitzt zahlreiche sogenannte regulatorische Proteine, um in Stresssituationen die Homöostase aufrecht erhalten zu können (PARK, 2002). Dabei spielt nach JENAL und HENNGE-ARONIS (2003) bereits die Regulation der Proteolyse eine entscheidende Rolle und offenbart ein Potential einer multiplen Signalintegration.

Die Anzahl regulatorischer Systeme ist geringer als zum Beispiel bei *E. coli* und *Bacillus (B.) subtilis*. Der nah verwandte *Helicobacter (H.) pylori* enthält ebenfalls nur eine minimale Anzahl globaler Regulationssysteme, ist aber, im Gegensatz zu *C. jejuni*, auch nicht in der Lage, auf extremen Stress außerhalb des Wirtes zu reagieren (PARK, 2000).

Bekannte Regulationsmechanismen beinhalten die Modifikation von Sigmafaktoren, welche sich an die RNA-Polymerase binden, dem Promotor Spezifität verleihen und somit direkt in die generelle Stressantwort involviert sind (ABEE et al., 1999).

In *C. jejuni* finden sich lediglich drei Sigmafaktoren (σ^{70} , σ^{54} , σ^{28}), im Gegensatz zu *B. subtilis* (17 Sigmafaktoren) und *E. coli* (6 Sigmafaktoren) (PARK, 2002; JAGANNATHAN et al., 2001). Das Fehlen spezifischer Sigmafaktoren wie *RpoS* und σ^{32} (Hitzestress), sowie globaler Regulationsproteine wie *OxyR*, *SoxRS* und *Lrp* lassen auf alternative Regulationsmechanismen mit übergreifender Funktion vorhandener Sigmafaktoren und/oder das Vorhandensein alternativer Regulationsmechanismen schließen (PARK, 2000; PARKHILL et al., 2000).

Die Präsenz einer Anzahl von Zwei-Komponenten-Systemen deutet auf deren zentrale Rolle in der physiologischen Reaktion und Adaptation von *Campylobacter* auf seine Umwelt hin (MACKICHAN et al., 2004).

Extrazelluläre Regulationsprozesse

Bei *Campylobacter* wurden einzelne Quorum sensing Effekte beschrieben.

Als Quorum sensing wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, miteinander zu kommunizieren. Dabei produzieren und sekretieren sie Signalmoleküle, die als Autoinduktor bzw. als Pheromone wirken. Diese können die Zellmembran leicht passieren. Überschreitet die Konzentration einen bestimmten Schwellenwert, setzt über einen spezifischen Rezeptor die Autoinduktion ein und es wird die Expression spezifischer Gene aktiviert.

MURPHY et al. (2003a) schreiben einem extrazellulären Protein einen protektiven Effekt bezogen auf Säure- und Hitzestress zu und beschreiben somit einen neuen Mechanismus der Stresstoleranz von *C. jejuni*. ELVERS und PARK (2002) gehen davon aus, dass ein extrazelluläres Signalsystem in *C. jejuni*, welches auch ein *LuxS*-Homologes enthält, eine Rolle in der Motilität des Bakteriums spielt und möglicherweise auch in globale Regulationsmechanismen der Physiologie und der Virulenz involviert ist.

2.4.1 Reaktion von *Campylobacter* spp. auf Stressoren in der Lebensmittelkette

Reaktion von *C. jejuni* auf Hitzestress

Auf eine Temperaturerhöhung reagiert der Mikroorganismus mit der Synthese von Proteinen, die vor einer Zellschädigung schützen und die Regeneration von Membranbestandteilen ermöglichen sollen. Viele dieser Strukturen sind evolutionär sehr stark konserviert und werden als Hitzeschockproteine (HSP) bezeichnet (ARSENE et al., 2000).

Das Repertoire der Hitzeschockproteine von *C. jejuni* gleicht denen anderer Bakterien, ihre Regulation jedoch ist weitestgehend ungeklärt. Hitzeschockproteine sind vor einem Temperaturanstieg bereits nachweisbar, werden aber massiv auf einen Hitzeschock folgend synthetisiert. KONKEL et al. (1998) wiesen über die zwei dimensionale Gelelektrophorese 24 Proteine nach, welche auf einen Hitzeschock folgend synthetisiert wurden. Auch unter Einwirkung anderer Stressoren, wie Säurestress und oxidativer Stress, wird die Synthese von Hitzeschockproteinen induziert (ABEE et al., 1999; KONKEL et al., 1998). Hauptsächlich werden diesen Proteinen Proteasen und molekulare Chaperone zugeordnet, so z.B. *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groEL*, *groES*. Ihre Induktion kann auch als Hinweis für ablaufende

Kreuzprotektionen interpretiert werden. Publikationen über Funktionen von Hitzeschockproteinen in *C. jejuni*- Keimen werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

C. jejuni hat keinen spezifischen Sigma-Faktor für die Regulation der Hitzeschockantwort (PETERSEN et al., 2003). Drei regulatorische Systeme, das *RacRS* Regulon, *HrcA* und *HspR*, kontrollieren nach PARK (2000) die Induktion der Hitzeschockreaktion bei *C. jejuni*: Das *RacRS* Regulon, charakterisiert als Zwei-Komponenten-Regulationssystem, wird für die unterschiedliche Expression von Proteinen bei 37 °C und bei 42 °C benötigt (BRAS et al., 1999a). Homologe von *hrcA* und *hspR* wirken als negative Regulatoren (SCHULZ et al., 1996) .

Die Hitzeschockregulation spielt im Hinblick auf die Thermotoleranz des Bakteriums eine Rolle, sichert somit die Überlebensfähigkeit, kontrolliert die Expression virulenter Gene und beeinflusst somit die Pathogenese von *C. jejuni*-assoziierter Enteritis (KONKEL et al., 1998). In einer Mikroarray Analyse misst STINTZI (2003) bei einem Temperaturanstieg von 37 °C auf 42 °C erstmals Genexpressionsunterschiede im gesamten *C. jejuni*-Genom und gibt einen globalen Überblick über induzierte und reprimierte Gene.

Tabelle 1: Hitzeschockgene und ihre Funktionen

Gen	Gen-Nummer	Funktion des Proteins	Referenz
<i>cbpA</i>	Cj 1229	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bindungsprotein 	Sanger Institut (2007)
<i>c/pB</i>	Cj 0509	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chaperon ▪ In die Reparatur hitzeinduzierter Zellschäden involviert ▪ Kooperation mit <i>dnaK</i>, <i>dnaJ</i>, <i>grpE</i> ▪ Regulation der Proteolyse, als Antwort auf Umweltstress 	THIES et al. (1999b), PARK (2000), Sanger Institut (2007)
<i>dnaJ</i>	Cj 1260	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chaperon ▪ Stimuliert gemeinsam mit <i>grpE</i> die ATPase-Aktivität von <i>dnaK</i> 	KONKEL et al. (1998), PARK (2000)
<i>dnaK</i>	Cj 0759	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chaperon 	THIES et al. (1999b), PARK (2000)
<i>groL</i> Synonym: <i>groEL</i> , <i>mopA</i>	Cj 1221	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chaperonin (Hsp 60) ▪ Verhindert Missfaltungen von Proteinen und fördert die Refaltung 	THIES et al. (1999c), Sanger Institut (2007)
<i>groS</i> Synonyme: <i>groES</i> , <i>mopB</i>	Cj 1220	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chaperonin (Hsp 10) ▪ Bindet an <i>groL</i> und unterdrückt dessen ATPase-Aktivität 	THIES et al. (1999c), Sanger Institut (2007)
<i>grpE</i> Synonym: Hsp-70 Cofaktor	Cj 0758	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aktive Teilnahme an der Hitzeschockantwort und Reaktion auf hyperosmotischen Stress durch Unterdrückung der Aggregation denaturierter Proteine ▪ Thermosensor ▪ Proteinfaltung gemeinsam mit <i>dnaK</i> und <i>dnaJ</i> 	PARK (2000)
<i>hrcA</i>	Cj 0757	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Repressor von <i>grpE-dnaK-dnaJ</i> und <i>groELS</i> Operons 	Sanger Institut (2007)
<i>hspR</i>	Cj 1230	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Negativkontrolle von Hitzeschockoperons ▪ Regulation der Transkription 	PARK (2000)
<i>htpG</i>	Cj 0518	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chaperon 	Sanger Institut (2007)
<i>tig</i>	Cj 0193	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chaperon ▪ Involviert in den Proteinexport 	GRIFFITHS et al. (1995)

Reaktion auf weitere Stressoren

Während der Lebensmittelproduktion und –zubereitung bestimmen verschiedene kombinierte oder einzelne Stressoren wie oxidativer Stress, osmotischer Stress, DNA-Schäden, Hitzestress, verschiedene Wachstumsphasen, Stress durch Nährstofflimitation und pH-Stress das Überleben von *Campylobacter* (PARK, 2000b). Die Überlebensdauer von *Campylobacter* spp. ist abhängig von der Lagertemperatur, dem Kontakt zu Sauerstoff und vom Lebensmittelmedium. Der Mikroorganismus “fühlt” den Stress, z.B. beim Kälteschock durch eine veränderte Membranfluidität oder bei γ -Strahlung durch geschädigte Nukleinsäuren (YOUSEF und COURTNEY, 2003).

Tabelle 2: Beispiele für mögliche Stressoren für *C. jejuni* in der Lebensmittelkette (modifiziert nach YOUSEF und COURTNEY (2003))

Faktor	Umwelt	Lebensmitteltechnologie	Haushalt	Wirt
Hitzschock	Wetterabhängig	Mildes Erhitzen	Erhitzen	Fieber
Kälteschock	Wetter	Tiefkühlen	Verschiedene Kühl- und Tiefkühlbedingungen	---
Säure	Saurer Regen Fermentation (Silageproduktion)	Zusätze von organischen Säuren und deren Salzen	Zusätze während Lebensmittelzubereitung (z.B. Essig, Zitronensäure)	Magensäure
Osmotische Veränderungen	Salzgehalt des Bodens Bewässerung	Lebensmittelzusätze (z.B. Salz) Konzentrationsänderungen Wasserentzug	Zusätze während Lebensmittelzubereitung	---
Oxidation	Exposition an der Luft	Exposition an der Luft Reinigungs- und Desinfektionsmittel	Exposition an der Luft	Makrophagen

Das Temperaturoptimum für das Wachstum des Erregers liegt zwischen 37 °C und 42 °C. Sie sind nicht in der Lage, sich unterhalb von 30 °C zu replizieren, so dass eine Vermehrung von *Campylobacter* während der Zubereitung und Aufbewahrung bei Raumtemperatur nicht bzw. nur selten erfolgen kann (JACOBS-REIMTSMA, 2000; PARK, 2000; HAZELEGER et al., 1998). Unterhalb ihrer Wachstumstemperatur sind sie jedoch weiterhin physiologisch aktiv (HAZELEGER et al., 1998). Die Keimzahl im Lebensmittel wird nachweislich durch Einfrieren reduziert, jedoch ist der Grad der Reduktion abhängig von der Temperatur, der Lagerungsdauer und der Kühlmethode (ZHAO et al., 2003). So wirkt sich das industriell übliche Superchillen (schnelles Herunterkühlen auf –3,3°C, weiteres Einfrieren in flüssigem Stickstoff) nur bei einer Lagerung von –196°C (nicht aber bei –80°C und –160°C)

reduzierend auf die Keimzahl von *C. jejuni* aus (ZHAO et al., 2003). Eine Lagerung von Fleisch bei -18°C bis -30°C reduzierte die *Campylobacter*-Population nach 72 h bis 7 Tagen um 0,6 bzw. 2,2 \log_{10} KbE/g (ZHAO et al., 2003; MOORHEAD et al., 2002). Der VBNC-Status sichert das Überleben von *C. jejuni*-Zellen in einer niedrigen Umgebungstemperatur. Anders als bei z.B. *E. coli* beobachtet, werden von *Campylobacter* spp. keine Kälteschockproteine synthetisiert.

Die Wirkung verschiedener Lagerungstemperaturen (-20°C , -70°C , 4°C , Raumtemperatur) sowie verschiedener Verpackungen auf die Überlebensfähigkeit von *C. jejuni* wurde von LEE et al. (1998) anhand inokulierter Hühnerhaut untersucht. Dabei konnte unter Bedingungen, wie sie möglicherweise in Verbraucherhaushalten vorkommen, ein reduzierter, aber andauernder Nachweis der Keime auf dem Fleisch, trotz wiederholter Gefrier- und Tau-Zyklen, erfolgen. Verschiedene Faktoren, wie die der Eiskristallformation, der Eisbildung und Dehydration werden mit der Schädigung von Bakterienzellen in Verbindung gebracht. Neue Erkenntnisse zeigen, dass oxidativer Stress *C. jejuni* im Prozess des Gefrierens und Auftauens zusätzlich reduzierend auf die überlebende Keimzahl wirkt (STEAD et al., 2000).

Campylobacter spp. sind mikroaerophil und daher besonders sensitiv gegenüber Sauerstoff und dessen Reduktionsprodukten. Sie zeigen jedoch Mechanismen, sich auch unter Sauerstoff anzupassen. Dabei spielen eine Reihe von Enzymen wie die Superoxiddismutase (SOD), Alkylhydroperoxidreduktase (AhpC und AhpF), die Katalasen (KatA) sowie Glutathion-Synthetasen und Glutathionreduktasen eine entscheidende Rolle im Schutz der Zelle von *Campylobacter* spp. unter oxidativem Stress (PARK, 2000).

Für sein Überleben benötigt *Campylobacter* ausreichend Feuchtigkeit. Auf trockenen Oberflächen stirbt das Bakterium speziell bei Raumtemperatur sehr schnell ab. *Campylobacter* überlebt im Wasser doppelt so lange wie in steriler Kultur. Dabei spielt die Temperatur eine entscheidende Rolle (BUSWELL et al., 1998). Eine *in vitro*-Studie ergab, dass Geflügelsaft einen protektiven Effekt auf *C. jejuni* hatte und der Erreger länger Stresssituationen ausgesetzt werden konnte, ohne signifikante Senkungen der Keimzahl hervorzurufen (BIRK et al., 2004). Außerdem müssen nach KÄRENLAMPI und HÄNNINEN (2004) frische Produkte wie Obst, Gemüse, Rohmilch und Wasser, durch ihren relativ hohen a_w -Wert und neutralen pH-Wert, in der quantitativen Risikoanalyse lebensmittelbedingter Campylobacteriosen beachtet werden.

Tabelle 2 : Beispiele für das Überleben von *C. jejuni* unter verschiedenen Bedingungen

Zeitdauer	Umgebungs- temperatur	Lebensmittel	Änderung in der <i>Campylobacter</i>-Population	Referenz
4 h	Raum- temperatur	Arbeitsfläche (Stahl)	Kontinuierliche Abnahme der Keimzahl von 5 log auf 0 nach 4h	KUSUMANINGRUM et al. (2003)
72 h	7 °C 21°C	Gemüse und Obst	> 1/2 der inokulierten Keime nachweisbar < 1/3 der inokulierten Keime nachweisbar	KÄRENLAMPI und HÄNNINEN (2004)
43-22 h	22 °C-37 °C	Wasser	deutliche Reduktion	BUSWELL et al. (1998)
24 Tage	5 °C	Hähnchenflügel	Konstante Keimpopulation	ZHAO et al. (2003)
60 Tage	5 °C	Wasser	Überleben des Keimes	THOMAS et al. (1999)
112 Tage	-18 °C	Rindfleisch	Keimreduktion, jedoch keine subletale Schädigung	MOORHEAD et al. (2002)

Der Mikroorganismus reagiert sensibel auf Säure und Salz (ALTEKRUSE et al., 1999). Das pH-Wert-Optimum von *Campylobacter* spp. liegt im Bereich 6,5 bis 7,7, wobei der Erreger unter bestimmten Vorraussetzungen einen maximalen pH-Wert von 9 und ein Minimum von pH 4,9 tolerieren kann (ANONYMOUS, 2003a; JACOBS-REIMTSMA, 2000). In Genexpressionsstudien von REID et al. (2008) wurde auf einen sauren Stress folgend die Expression von Hitzeschockgenen und Genen, die im Zusammenhang mit oxidativem und nitrosativem Stress erkannt wurden, stark induziert. Dabei zeigen differente Ergebnisse in der Stressantwort von *in vivo*- und *in vitro*-Genexpressionsstudien, dass die Komplexität von Stressoren in der Umwelt beachtet werden muss.

Wichtig für die Überlebensfähigkeit der Zelle ist, in welcher Wachstumsphase sie sich befindet, denn ein Eintritt in die stationäre Phase ist mit physiologischen Veränderungen und bei anderen Bakterienspezies mit einer zunehmenden Resistenz gegenüber Stressoren verbunden. Untersuchungen zeigen keine Erhöhung der Stressresistenz von *C. jejuni* in der stationären Wachstumsphase. Die Resistenz gegenüber einem milden Stress (50 °C, Sauerstoff) war in der exponentiellen Phase vergleichsweise größer (KELLY et al., 2001). Die Bakterienkultur von *C. jejuni* wird in der stationären Phase als dynamische Population mit schwankenden Hitzeresistenzen beschrieben, welche das Überleben einiger Stämme in der Subpopulation als mögliche Überlebensstrategie nutzen (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2004; KELLY et al., 2001).

Die Studie von ALTER et al. (2002) zeigte, dass *Campylobacter*-Stämme in ihrer Fähigkeit, schlachthofspezifische Stressoren (Temperatur des Brühbades, Kühlung - kombiniert mit Austrocknung der Putenoberfläche) zu überwinden, variieren. Einige hoch verwandte

Campylobacter-Stämme waren in der Lage, diesen Stressoren zu widerstehen und konnten nach Beendigung der Luftkühlung weiterhin auf den Putenschlachtkörpern aufgefunden werden. Diese Subtypen zeigten eine hohe Verwandtschaft mit humanen *Campylobacter*-Stämmen. Demnach ist die Überlebensfähigkeit von *Campylobacter* zum einen abhängig vom *Campylobacter*-Stamm, denn diese weisen sowohl phänotypische als auch genotypische Unterschiede auf, zum anderen von der technologischen Behandlung des Lebensmittels (GAYNOR et al., 2004; AHMED et al., 2002).

Die aufgeführten Verhaltensweisen deuten darauf hin, dass abhängig vom *Campylobacter*-Stamm, der vorliegenden Keimzahl, der Art des Lebensmittellmediums und der Lagerungstemperatur *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln längere Perioden der Einwirkung verschiedener Stressoren überleben können. Eine Vermehrung im Lebensmittel ist dagegen sehr unwahrscheinlich (PARK, 2002; JACOBS-REIMTSMA, 2000; HUMPHREY, 1999).

VBNC-Status

Neben der hochgradigen genetischen Heterogenität der *Campylobacter*-Population erwies sich der Eintritt in den VBNC-Status als potentieller Überlebensmechanismus (MURPHY et al., 2003b). Das Phänomen des VBNC-Status wurde zum ersten Mal von ROLLINS und COLWELL (1986) beschrieben. Unter ungünstigen Umweltbedingungen ist *Campylobacter* in der Lage, in einen nicht kultivierbaren Status überzugehen. Dieser ist assoziiert mit einer morphologischen Veränderung des Mikroorganismus von seiner natürlichen spiralförmigen Erscheinung in die kokkoide Form (PARK, 2002). *Campylobacter* ist in diesem Status nicht mehr kulturell anzüchtbar, der Mikroorganismus hält jedoch essentielle metabolische Aktivitäten weiterhin aufrecht. Über die Messung dieser metabolischen Aktivität und den Nachweis über Aufrechterhaltung zellulärer Strukturen und Nukleinsäuren kann die Lebensfähigkeit von *Campylobacter* nachgewiesen werden (LAZARO et al., 1999). Wie schnell der Mikroorganismus in diesen Status eintritt, ist abhängig vom Stressor. So ist nach Lagerung von *C. jejuni* bei 4 °C nach 25 Tagen ein Eintritt in den VBNC-Status nachweisbar, dagegen nach einem Hitzestress von 60 °C wurde ein Eintritt in den VBNC-Status bereits nach 15 min von TANGWATCHARIN et al. (2006) beschrieben.

Bis dato gibt es experimentelle Untersuchungen zum Eintritt von *Campylobacter* in den VBNC-Status nach pH-Stress (CHAVEERACH et al., 2003), nach Hitzestress (TANGWATCHARIN et al., 2006), durch Nährstofflimitation und durch oxidativen Stress (JANG et al., 2007). Die gestressten Mikroorganismen blieben weiterhin infektiös im Lebensmittel, wie in Hühnerhaut und Wasser nachgewiesen (JANG et al., 2007; THOLOZAN et al., 1999). Dies verdeutlicht, dass der VBNC-Status dem Mikroorganismus eine lange Überlebensmöglichkeit verleiht. LAZARO et al. (1999) konnten eine intakte DNA von *C. jejuni*

nach 7 Monaten Lagerung (4 °C) nachweisen. Mit diesen Erkenntnissen werden Interventionsmaßnahmen, wie z.B. die der Dekontamination von Wasser mit organischen Säuren, in Frage gestellt (CHAVEERACH et al., 2003). Auch scheint der VBNC-Status eine Rolle in der humanen Infektion mit *Campylobacter* zu spielen (CHAVEERACH et al., 2003; HAZELEGER et al., 1995).

Ob die Bakterienzelle in einen VBNC-Status eintritt, ist nicht nur abhängig vom Stressor, sondern auch vom *Campylobacter*-Stamm. In einer Studie mit 36 verschiedenen humanen *C. jejuni*-Stämmen wurde bei lediglich drei Stämmen der Eintritt in den VBNC-Status nachgewiesen (THOLOZAN et al., 1999).

2.4.2 Stressadaptation und Lebensmittelsicherheit

Um das Überleben von *Campylobacter* in der Lebensmittelkette zu untersuchen, sind Untersuchungen seiner ungewöhnlichen Physiologie notwendig (PARK, 2002).

Es wird vermutet, dass Mikroorganismen bei extremem Stress, so wie er unter lebensmitteltechnologischer Verarbeitung eines Nahrungsmittels vorkommt, vorübergehend einen noch nicht genau bekannten Mechanismus aktivieren, der die Mutationsrate für das ganze Genom erhöht und spezifische Mutationen auslöst (JONES et al., 2004; YOUSEF und COURTNEY, 2003).

Werden Mikroorganismen einem milden Stressor, d.h. ohne dass subletale Schädigungen der Bakterienzellen erfolgen, ausgesetzt, reagiert der Organismus durch eine veränderte Genexpression. Infolge dieser Stressreaktion kann es zur Ausbildung sogenannter adaptativer und protektiver Mechanismen gegenüber nachfolgender Stressoren kommen. Die Fähigkeit der Entwicklung solch adaptiver Stresstoleranzmechanismen von *C. jejuni* zeigten MURPHY et al. (2003b) in ihren Untersuchungen. *C. jejuni* wurde zunächst mildem (pH 5,5), später starkem Stress (pH 4,5) ausgesetzt und zeigte nach solcher Adaptation an einen Einzelstressor eine 100fach größere Überlebenschance als im unadaptierten Zustand. Des Weiteren hatte eine aerobe Adaptation eine 500fach höhere Überlebensfähigkeit von *C. jejuni* gegenüber Säurestress zur Folge. Die Fähigkeit von *Campylobacter*, sich an verschiedene Stressoren zu adaptieren, bedarf dabei einer globalen Genregulation, um mit einer kompetenten Stressantwort reagieren zu können (KONKEL et al., 2000). Die adaptive Stressantwort wird nicht in der exponentiellen Wachstumsphase (wie z.B. bei *E. coli*, *Salmonella*), sondern in der frühen stationären Phase induziert (MURPHY et al., 2003b). Denn *Campylobacter* spp. fehlen adaptive Reaktionen, die anderen pathogenen Lebensmittelinfektionserregern Stressresistenz bietet. So sind beispielsweise *E. coli* und *Salmonella* u.a. in der stationären Phase durch die Regulation des Sigmafaktors *RpoS* gegen Stress geschützt (PARK, 2002). Dieser *RpoS* Homologe wird in der Genomanalyse von *C. jejuni* NCTC 11168 nicht gefunden. So schlussfolgern MURPHY et al. (2003b), dass

Campylobacter meist in der stationären Phase in der Umgebung vorkommen und dass die Fähigkeit, eine adaptative Stressantwort in dieser Wachstumsphase zu induzieren, ein signifikanter Faktor in der Überlebensstrategie des Mikroorganismus ist.

Dabei müssen „milde“ Stressoren besonders kritisch beurteilt werden, da sie möglicherweise keine Hürde der Lebensmitteltechnologie für das Überleben von *C. jejuni* darstellen, sondern die Ausbildung von Adaptationsmechanismen durch den Mikroorganismus bewirken.

2.4.3 Interventionsmaßnahmen

Ansätze zur Prävention einer humanen *Campylobacter*-Infektion sind nach KIST (2002) die Quarantänehaltung des Schlachtgeflügels, Verzicht auf das sogenannte „Ausdünnen“ der Bestände, Dekontamination der Transportkäfige, das Vorziehen der Schlachtung nichtinfizierter Bestände (wobei die logistische Schlachtung kontrovers diskutiert wird), höchstmögliche Brühtemperaturen der Schlachtkörper, Abkühlung der Körper im Kühlbad, Zusatz antimikrobieller Substanzen zum Prozesswasser und möglicherweise zukünftig eine dekontaminierende Schlussbehandlung. Eine signifikante Senkung des Erkrankungsrisikos einer mit Hähnchenfleisch assoziierten *Campylobacter*iose wurde durch eine qualitative und vor allen quantitative Reduktion der *Campylobacter*-Kontaminationen in den Hähnchenkarkassen ermittelt (FEHLHABER, 2007). Ohne Einfluss blieben Maßnahmen der logistischen Schlachtung (ROSENQUIST et al., 2003). Eine Reduzierung der *Campylobacter*-Infektionen wird neben der Aufklärung des Verbrauchers auch durch den frühen Eingriff in die Lebensmittelproduktion erreicht (ROSENQUIST et al., 2003).

Da Wasser eine der wichtigen Infektionsquellen für *Campylobacter* darstellt, empfiehlt sich eine Behandlung mit organischen Säuren oder Chlor.

Organische Säuren, einzeln oder in Kombinationen angewendet, zeigen in Experimenten auf *Campylobacter* spp. einen starken bakteriziden Effekt. So könnten Applikationen von organischen Säuren, z.B. als Wassersupplement auf Geflügelfarmen präventiv eingesetzt werden (CHAVEERACH et al., 2002). Bisher sind jedoch laut §11 der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001) zur Dekontamination von Wasser nur Chlor- und Chlorklösungen, Ozon und Ozonlösungen und UV-Bestrahlung (240-290 nm) zugelassen. Auf eine Chlorierung reagiert *Campylobacter* sehr empfindlich. Jedoch ist der Einsatz von Chlor als alleiniges Mittel zur Kontaminationsprävention von Wasser nicht geeignet, da organische Substanzen (z.B. Vogelfäkalien), sobald sie in das Wasser gelangen, Chlor binden und somit der bakterizide Effekt unterbunden wird (STERN et al., 2002). Dagegen reagiert *Campylobacter* sehr sensitiv auf ionisierende Strahlung. D₁₀-Werte von 0,18 kGy in gekühlten Fleischprodukten und 0,3 kGy in gefrorenem Fleisch führen zu einer effektiven Reduzierung der Keimzahl (ANONYMOUS, 2003b; FARKAS, 1998). *Campylobacter* reagiert

weitaus empfindlicher auf UV-Strahlung als beispielsweise *E. coli* (JACOBS-REIMTSMA, 2000). So konnten OBIRI-DANSO et al. (2001) *Campylobacter* spp. nach 10 min UV-Bestrahlung nicht mehr kultivieren.

Während des Schlachtprozesses finden in der Praxis beispielsweise in einigen Ländern Milchsäure-Sprays Einsatz, welche das Kontaminationslevel mit *Campylobacter* reduzieren (JACOBS-REIMTSMA, 2000). Futterzusätze für Geflügel wie organische Säuren, Gewürze, Probiotika und Oligosaccharide sind keine wirkungsvolle Bekämpfungsstrategie (GLÜNDER et al., 2000). Impfungen der Tiere waren bisher nicht erfolgreich. Eine vielversprechende, wenn auch noch sehr kostenintensive Intervention in der Geflügelaufzucht stellt die Phagentherapie dar. Bakteriophagen inaktivieren selektiv *Campylobacter* und sind für die menschliche Gesundheit ungefährlich (HAVELAAR et al., 2007). Experimente zeigten im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine um 10^2 KbE/g niedrigere *Campylobacter* Belastung im Faeces an (WAGENAAR et al., 2005).

Das Konservieren von Lebensmitteln unter hohen Temperaturen, wie das Blanchieren, das Pasteurisieren und das Sterilisieren, sind heute übliche Prozesse in der Lebensmittelproduktion. Eine Reduktion oder Inaktivierung bakterieller Populationen lässt sich über thermale Prozesse unter Nutzung unterschiedlichster Mittel, wie Wasser, Dampf, heißer Luft, Elektrizität, Licht und Mikrowellenenergie, erreichen (ABEE et al., 1999).

Wichtig für den Verbraucher zum Schutz vor *Campylobacter*-Infektionen im Haushalt ist die Vermeidung von Kreuzkontaminationen durch eine konsequente Einhaltung der Küchenhygiene, insbesondere bei der Zubereitung von frischem oder tiefgefrorenem Geflügel (FEHLHABER, 2007).

Probleme treten bei frischen, unbehandelten Lebensmitteln auf. Verbraucher fragen zunehmend wenig behandelte, natürlich belassene Produkte mit hoher Qualität und günstigem Preis/Leistungsverhältnis nach, so dass an die Lebensmitteltechnologie stets hohe Anforderungen gestellt werden. Das Risiko, dass Lebensmittelprodukte durch den Produktionsprozess rekontaminiert werden, kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Im Studium der Prozesse, die für die genomische Veränderung unter Stressbedingungen verantwortlich sind, liegt ein wichtiger Schlüssel im Verständnis der Überlebensfähigkeit von *Campylobacter*.

Denn mit der genauen Kenntnis der Stressregulation des Bakteriums und der damit verbundenen Aufklärung über notwendige Hygienemaßnahmen des Verbrauchers lassen sich lebensmittelassoziierte *Campylobacteriosen* durch Anwendung einer Hürdentechnik wirksam vermeiden (LEISTNER, 2000).

Weiterhin besteht ein dringender Forschungsbedarf im Hinblick auf Pathogenese, Epidemiologie und Überlebensmechanismen von *Campylobacter* spp.. Aus

Lebensmittelhygienischer Sicht ist die Kenntnis der Wachstumsgrenzen und der Adaptationsmechanismen eine wesentliche Voraussetzung zur Optimierung lebensmitteltechnologischer Verfahren zur Senkung der *Campylobacter*-Belastung in Lebensmitteln.

3 Material und Methoden

3.1 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Studie wird die Reaktion des pathogenen Zoonoseerregers *C. jejuni* auf einen induzierten Hitzeschock analysiert. Globale Genexpressionsanalysen zur semi-quantitativen Trendbewertung, sowie eine relative Quantifizierung bekannter Hitzeschockgene und Chaperone sollen einen Überblick über das Verhalten des Bakteriums bei einem Temperaturanstieg und dessen Überlebensstrategien *in vitro* geben.

Zum methodischen Instrumentarium gehören die Real-Time PCR sowie die DNA Mikroarray-Technik.

Des Weiteren soll in dieser Arbeit exemplarisch geprüft werden, ob aviäre und humane *C. jejuni*-Stamm-Isolate hinsichtlich ihrer Thermotoleranz Unterschiede zeigen.

3.2 Kultivierung der Stämme

Alle Stämme wurden bei -80 °C gelagert. Nach Anzucht wurden die Kolonien der ausgewählten *C. jejuni*-Kulturen mit einer sterilen Öse in Bolton Bouillon (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) gebracht und 48 h unter mikraeroben Bedingungen (5 % O_2 , 10 % CO_2 , 85 % N_2) bei 37 °C im Brutschrank (APT. Line Serie BD/ED/F D (E2), Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bebrütet. Das mikraerobe Milieu wurde im Anaerobentopf (Merck & Co., Darmstadt, Deutschland) unter Zugabe von Anaerocult® C (Merck) erzeugt.

Um optimale Ergebnisse zu erzielen, wurden für die Genexpressionsanalyse mittels des Mikroarray-Chips ca. 50 µg RNA benötigt. Dementsprechend wurden 100 ml Bolton-Bouillon mit 1/40 einer 48 h Bouillon inokuliert und anschließend bei 37 °C im Schüttelinkubator (Orbi Safe Orbital Shaker, Sanyo Gallenkamp PLC, Loughborough, England) inkubiert. Nach Erreichen der log-Phase (nach ca. 16 h) wurde die Bouillon in 2 x 50 ml gesplittet. Der als Referenz genutzten Probe (37 °C) wurde sofort ein Volumen RNA-Stabilisationsreagent RNeasy®Protect (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zugegeben, die andere Probe wurde unter den angegebenen Inkubationsparametern erhitzt (vgl. 3.3.1) und unmittelbar danach mit einem Volumen RNeasy®Protect (Qiagen) versehen. Dieser Schritt diente dem „Einfrieren“ des vorliegenden Genexpressionsmusters und garantierte somit optimale Ergebnisse ohne Veränderungen des mRNA-Musters während der einzelnen Extraktionsschritte.

Die Bakterien-Bouillon für die quantitative PCR wurde mit einem Ansatz von 15 ml ebenso kultiviert und behandelt (vgl. 3.3.2).

Nach Ablauf der beschriebenen Kultivierungszeit hatte die Bakterien-Bouillon eine durchschnittliche Keimzahl von 10^9 KbE/ml, die in Vorversuchen ermittelt wurde (Abbildung 6, S.30). Die Messung der optischen Dichte war durch die dunkle Färbung der Bolton-Bouillon nicht möglich.

3.2.1 Verwendete Stämme

Für die Genexpressionsanalysen mit Hilfe der Real-time PCR und der Mikroarray-Analyse wurde das humane Isolat *C. jejuni* subsp. *jejuni* (CCUG 19506 = NCTC 11168) gewählt, dessen Oligonukleotidsequenzen auf dem *C. jejuni*-Komplettgenom-Mikroarray-Chip (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) gespottet sind. Weitere, in Tabelle 3 aufgelistete *C. jejuni*-Stämme wurden hitzestressiert und untersucht.

Tabelle 3: *C. jejuni* Stämme

Stammbezeichnung	Beschreibung	Herkunft
CCUG 19506	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> , NCTC11168, isoliert aus humanem Faeces (Enteritis), Penner biotyp 2, gelagert in FBP-Medium bei –80 °C	Universität Göteborg, Schweden
Han 36	<i>C. jejuni</i> , hochvirulent, geringe Kolonisierung, originär aus Medizinischer Hochschule Hannover gelagert in FBP-Medium bei –80 °C	Geflügelklinik Hannover
Av 355	<i>C. jejuni</i> , gelagert in FBP-Medium bei –80 °C	Friedrich Löffler Institut Jena
Av 503	<i>C. jejuni</i> , Putenkarkassen nach 24 h Kühlung (Putenschlachthof Mutzschen (7/2003)) gelagert in FBP-Medium bei –80 °C	Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig
J 130	<i>C. jejuni</i> , getestet auf Adhäsionsvermögen, Invasionsvermögen, Cytotoxin, Kolonisierung (Jena) gelagert in FBP-Medium bei –80 °C	Friedrich Löffler Institut Jena (3/2003)
P 1	<i>C. jejuni</i> , getestet auf Adhäsionsvermögen, Invasionsvermögen, Cytotoxin, Kolonisierung (Jena) gelagert in FBP-Medium bei –80 °C	Friedrich Löffler Institut Jena (3/2003)

3.2.2 Wachstumskurven

In einem Zeitraum von 48 h wurden für *C. jejuni* NCTC 11168 Wachstumskurven erstellt. Hierfür wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten 1 ml einer beimpften Anreicherungsbouillon (1 KbE in 10 ml Bolton-Bouillon) entnommen und in eine dezimale Verdünnungsreihe in 0,9 % physiologische Kochsalzlösung (Merck) eingesetzt. Der Verdünnungsstufe entsprechend wurden im Doppelansatz 100 µl auf mCCDA (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C unter mikroaeroben Bedingungen 48 h bebrütet und anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. *C. jejuni* bilden auf mCCDA-Platten (modifizierter Campylobacter Selektiv-Agar, blutfrei) kleine, runde, leicht erhabene, glatte, grau-glänzende Einzelkolonien. Diese können bei zu feuchtem Agar oder auch bei einer zu langen Bebrütungsdauer leicht schwärmen bzw. zerfließen.

Die Keimzahl berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{KbE/ml} = \sum c / n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1$$

KbE = Koloniebildende Einheiten

$\sum c$ = Summe der Kolonien aller Platten beider Verdünnungsreihen, die zur Berechnung herangezogen werden

n_1 = Anzahl der Platten der niedrigsten zählbaren Verdünnungsstufe

n_2 = Anzahl der Platten der nächst höheren zählbaren Verdünnungsstufe

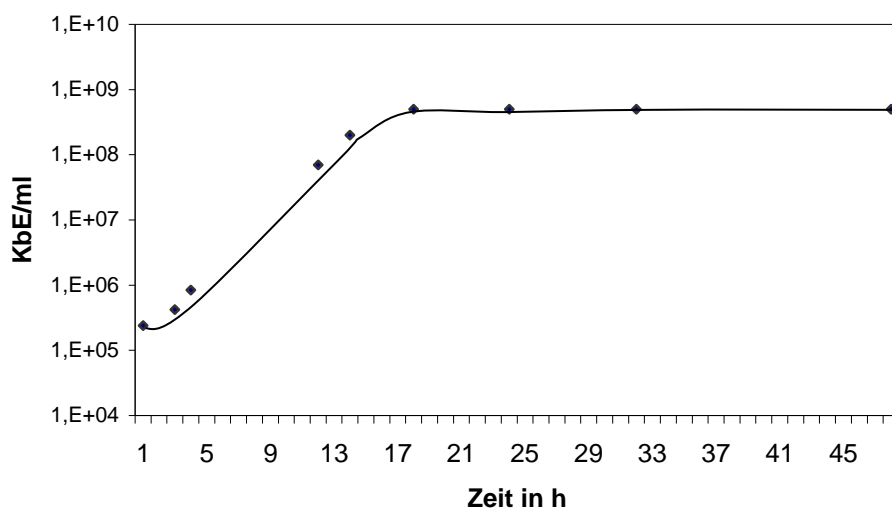


Abbildung 6: Wachstumskurve von *C. jejuni* (NCTC 11168) bei 37 °C

3.3 Temperaturen und Inkubationszeiten

Zur Induzierung einer Stressantwort wurden Hitzeschockexperimente durchgeführt. Die Bakterienbouillons wurden mit Hilfe eines Wasserbades (WB22, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland) unter leichtem Schütteln (Stufe 4) auf die Versuchsparameter erhitzt. Dabei wurde immer eine Kontrolle mit dem gleichen Flüssigkeitsvolumen mitgeführt und dessen Kerntemperatur mit einem Thermohygrometer (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) überwacht. Die Zeit der Stressorwirkung wurde ab dem Erreichen der Soll-Temperatur gemessen.

3.3.1 Mikroarray

Die Bakteriensuspensionen für die Kompletengenomanalysen wurden bei 46 °C zu verschiedenen Inkubationszeiten im Wasserbad unter Schütteln inkubiert und mit der Kontrollsuspension (37 °C) verglichen:

Tabelle 4: *C. jejuni* NCTC 11168 Hitzeschockbedingungen im Mikroarray-Experiment

Chip-Nummer	Vergleichsbedingung	Hitzeschockbedingung	Inkubationszeit
1-2*	37 °C	46 °C	5 min
3-4*	37 °C	46 °C	10 min
5-6*	37 °C	46 °C	20 min

* Bei den Untersuchungen wurden die Farbstoffe jeweils ausgetauscht, so dass eine Verifizierung unabhängig vom eingebauten Farbstoff erfolgte (technisches Replikat).

3.3.2 Quantitative PCR (Real-time PCR)

Für die quantitative PCR wurden verschiedene Temperaturen und Inkubationszeiten gewählt, um die Genexpressionsmuster ausgewählter Gene in verschiedenen Stadien beschreiben zu können (Tabelle 5). Die Erhitzung der Bakteriensuspensionen erfolgte im Wasserbad.

Tabelle 5: *C. jejuni* NCTC 11168, Bedingungen im Real-time Experiment

Inkubations- zeiten	Kalibrator- bedingung	Hitzeschockbedingungen				
		42 °C	44 °C	46 °C	50 °C	55 °C
5 min	37 °C	42 °C	44 °C	46 °C	50 °C	55 °C
10 min	37 °C	42 °C	44 °C	46 °C	50 °C	55 °C
20 min	37 °C	42 °C	44 °C	46 °C	50 °C	55 °C
40 min	37 °C	42 °C	44 °C	46 °C	50 °C	55 °C

3.3.3 Mikroskopie

Da sich mittels Mikroskopie keine eindeutige Aussage über die Lebensfähigkeit von *C. jejuni* unter beschriebenen Hitzeschockbedingungen (etwa durch das Auftreten vermehrt kokkoider Formen) machen ließ, wurde der LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) verwendet. Unter Nutzung zweier Farbstoffe mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften und unterschiedlichen Fähigkeiten zur Penetration in die bakterielle Zelle, können tote und lebende Zellen verschieden angefärbt und somit unterschieden werden. Die beiden Farbstoffe unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, durch die Zellmembran in das Cytoplasma von Bakterienzellen zu gelangen. Ein Farbstoff (Syto 9; Anregungsmaximum = 480 nm, Emmissionsmaximum = 500 nm) fluoresziert grün, bindet an DNA und färbt generell alle Bakterien an – solche mit intakter, als auch solche mit beschädigter Zellmembran. Im Gegensatz dazu penetriert der andere Farbstoff (Propidiumiodid; Anregungsmaximum = 490 nm, Emmissionsmaximum = 635 nm), der rot fluoresziert und ebenfalls an die DNA bindet, nur Bakterien mit geschädigter Zellmembran. Eine gleichzeitige Bindung beider Farbstoffe führt zu einer Reduktion von Syto 9. Beim Anfärben einer Bakteriensuspension mit dem LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit fluoreszieren Bakterien mit intakter Zellmembran grün, während Bakterien mit geschädigter Zellmembran rot fluoreszieren.

10 ml einer 24 h-Bouillon wurden mittels Zentrifugation (5 min 5000xg) pelletiert (5804R, Eppendorf). Anschließend wurde das Pellet zweifach mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Dem Ansatz wurden jeweils 0,3 µl Syto 9 und 0,3 µl Propidiumiodid zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Bakterienkultur unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX70 mit Power-Unit Olympus U-RFL-T, Olympus Optical CO. GmbH, Hamburg, Deutschland) betrachtet und fotografiert.

3.4 RNA Präparation

3.4.1 Extraktion

Nach der Zugabe von RNeasy®Protect (Qiagen) zur Bakteriensuspension erfolgte eine Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 3000xg zentrifugiert (Eppendorf 5804R, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in einem Milliliter Lysepuffer (1 µg Lysozym/1 ml TE-Puffer pH 8) (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) resuspendiert.

Daraufhin wurde die Gesamt-RNA (totale RNA) mit dem RNeasy® Midi Kit (Qiagen) extrahiert. Die Methode beruht auf der spezifischen Bindung der RNA an eine Silikamembran unter bestimmten Salzbedingungen.

Das in den Lysepuffer aufgenommene Bakterienpellet wurde mit 4 ml RLT-Puffer (40 µl β-Mercaptoethanol enthaltend (Roth) versetzt und 5 min bei 3000xg zentrifugiert. Daraufhin wurden alle nicht lysierten Bestandteile mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Dem klaren Lysat wurden 3 ml 100% Ethanol (Roth) zugefügt, der Ansatz vorsichtig gemischt und auf die RNeasy®-Säule aufgetragen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 3000xg wurde der Durchlauf verworfen. Auf die Säule wurden 4 ml RW1-Waschpuffer pipettiert und abzentrifugiert (5 min, 3000xg). Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit RPE-Puffer. Nach der Zentrifugation (5 min, 3000xg) wurden die Säule in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und in die Mitte der Silikamembran 150 µl RNase-freies Wasser pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute erfolgte eine Zentrifugation (3 min, 3000xg). Daraufhin wurde das Eluat nochmals auf die Säule gegeben, eine Minute inkubiert und abzentrifugiert (3 min, 3000xg).

Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte (5804R, Eppendorf) erfolgten bei Raumtemperatur.

3.4.2 DNase-Verdau

Im Anschluss an die RNA Extraktion wurde ein DNase-Verdau vorgenommen, um eine DNA-freie RNA Präparation zu gewährleisten. Mittels DNA-free™ (Ambion, Huntingdon, England) wurde der in RNase freiem Wasser gelösten RNA 10 µl DNase I Puffer und 1 µl DNase I (2 units) zugesetzt. Der Ansatz wurde 20 min bei 37 °C im Thermomixer (comfort, Eppendorf) inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Inaktivierungsreagenz wurde die Reaktion gestoppt. Das darauf folgende Zentrifugieren (2 min bei 10.000xg) (MiniSpin, Eppendorf) bewirkte ein Pelletieren des DNase-Inaktivierungsreagents. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

3.4.3 Ethanolpräzipitation

Mit dieser Methode werden Nukleinsäuren durch Zugabe von Ethanol und Salz als Natriumsalze aus wässrigen Lösungen ausgefällt. Die RNA Lösung wurde mit 1/10 des Ausgangsvolumens 3 M Natriumchlorid-Lösung und 200 µl absoluten Ethanol (-20 °C) (Roth) versetzt. Die Präzipitation erfolgte für 45 min bei -80 °C (HFU 586 HERAFreeze, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland). Im Anschluss wurde der Ansatz 10 min bei 20.000xg (MiniSpin, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol (-20 °C) (Roth) gewaschen und 7 min bei 20.000xg zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das getrocknete Pellet in 20 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) aufgenommen.

3.4.4 Kontrolle der Gesamt-RNA

Die zur Herstellung von fluoreszenzmarkierten Targets verwendete Gesamt-RNA muss vor der Markierung hinsichtlich ihrer Qualität beurteilt werden, da nur ausgehend von einer hochwertigen RNA bei Genexpressionsanalysen gute Ergebnisse erzielt werden können. Ebenso muss eine exakte Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge erfolgen, damit die experimentelle Aussage nicht durch ungleiche Ausgangsmengen beeinträchtigt wird.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde photometrisch in RNase-freiem Wasser (Qiagen) in einer Quarzküvette (10,00 mm) (Biochrom Ltd, Cambridge, England) durchgeführt. Dazu wurde die RNA in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Die Messung der Extinktion erfolgte zwischen $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm im Spektralphotometer (Spekol 1200, Analytik Jena AG, Deutschland). Mittels der gemessenen Absorptionswerte wurde die Konzentration der RNA berechnet und ihre Reinheit bestimmt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Ein Quotient E_{260}/E_{280} von 1,8 – 2,0 lässt auf eine Reinheit der RNA von 70 – 95 % schließen (SAMBROOK et al., 1989).

Nur bei Erreichen einer Reinheit der RNA von mindestens 1,8 wurde die Probe weiter genutzt.

Berechnung der Konzentration (c):

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = E_{260 \text{ nm}} \times 40 \text{ }\mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

E = Extinktion

($E_{260 \text{ nm}} = 1$; entspricht etwa 40 µg RNA/ml)

Nach jeder Messung wurde die Küvette gründlich mit DEPC-Wasser (Roth) gespült.

Präparation der Gele

Die Gelelektrophorese dient der Identifizierung und Trennung von Nukleinsäure-Fragmenten und beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld.

Zur Herstellung eines 1%igen Gels wurde 1 g Agarose (peqGOLD Universal Agarose, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) eingewogen (Satorius Basic^{lite}, Satorius AG, Göttingen, Deutschland) und in 100 ml 1 x TBE-Puffer (Roth) gelöst. Nach einer kurzen Quelldauer wurde die Lösung in der Mikrowelle (ciatronic) aufgeköcht und bei etwa 60 °C in den abgeklebten Gelschlitten (7 x 8 cm) mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Verfestigung des Gels wurde der Kamm vorsichtig gezogen, das Gel in die Elektrophoresekammer (PerfektBlue Minigelsystem S, Peqlab), 1 x TBE-Puffer enthaltend, überführt und die Laufparameter am Spannungsgerät (Consort Power Supply E 835, Peqlab) eingestellt (5 V/cm).

Kontrolle auf DNA-Kontamination

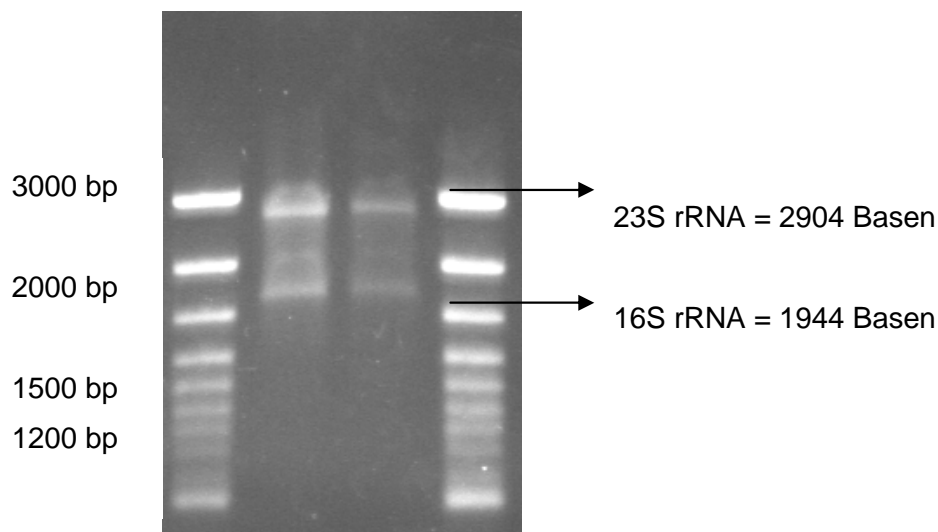


Abbildung 7: Überprüfung isolierter Gesamt- RNA (glyoxalbehandelt) aus *C. jejuni* auf 1%igem nativem Agarosegel auf DNA-Kontamination

Eine Kontrolle einer eventuellen DNA-Kontamination in der RNA-Präparation ließ sich über die Gelelektrophorese detektieren. Dazu wurde die RNA zunächst mit dem Glyoxal Sample Loading Dye (Ambion) nach Herstellerangaben behandelt, um sie zu denaturieren. In dem Reaktionsgemisch sind bereits Ladepuffer und Ethidiumbromid (10 µg/ml) enthalten. Der Längenmarker (Molekulargewichtsmarker 100 plus, Peqlab) wurde mit Ladepuffer und Ethidiumbromid (Roth) versehen, um anschließend zusammen mit dem Ansatz auf ein 1%iges, horizontales Agarosegel aufgetragen zu werden. Dabei begrenzte der

Längenmarker die Proben in den äußeren Geltaschen. Nach einer Laufzeit von 1 h bei 5 V/cm wurde das Gel in der Dunkelkammer (Multimage™Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) unter UV-Licht betrachtet. Mit einer CCD-Videokamera wurde das RNA- Bandenmuster aufgenommen.

Dabei sollten die 23S und die 16S rRNA als klare Banden zu erkennen sein. Eine DNA-Kontamination würde als zusätzliche Bande sichtbar werden. Abbildung 7 präsentiert qualitativ hochwertige RNA.

3.5 Herstellung der Targets

3.5.1 Reverse Transkription - Mikroarray

Für das Mikroarray-Experiment wurde die reverse Transkription, einschließlich des Einbaus fluoreszenzmarkierten dCTPs und einem Reinigungsschritt mit Hilfe des LabelStar Array Kits (Qiagen) durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Cy 3 und Cy 5 (Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet. Deren Spektren sind in Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6: Verwendete Farbstoffspektren

Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Cy 3	550 nm	570 nm
Cy 5	650 nm	670 nm

Zunächst wurde die RNA auf 50 µg/18 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) eingestellt und anschließend mit 2 µl Denaturierungslösung (Qiagen) versehen. Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C im Thermocycler (Tpersonal, Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf Eis gestellt. Der Ansatz des Mastermixes erfolgte ebenfalls auf Eis. Volumina der einzelnen Komponenten sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Der Probenansatz wurde zwei Stunden im Thermocycler (Biometra) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 µl Stop Solution (Qiagen) abgestoppt.

Um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte dCTPs zu entfernen, wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt durchgeführt. Dieser erfolgte mittels Säulentechnik nach Herstellerangaben und war dem LabelStar Array Kit (Qiagen) beigelegt.

Die markierte cDNA wurde 30 min bei 30 °C in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf *concentrator* 5301) aufkonzentriert.

Tabelle 7: Mastermix für die reverse Transkription, einschließlich Markierung der cDNA

Komponente	Volumen pro Reaktion
10 x Puffer RT (Qiagen)	5,0 µl
dNTP-Mix (Qiagen)	5,0 µl
Cyanine 3 oder	
Cyanine 5 gelabelte dCTP (1 mM) (Amersham Pharmacia Biotech)	1,0 µl
Random Hexamer Primer (3 µg/µl) (Invitrogen)	5,0 µl
RNase Inhibitor (40 Units/µl) (Qiagen)	0,5 µl
RNase-freies Wasser (Qiagen)	11,0 µl
LabelStar Reverse Transkriptase (Qiagen)	2,5 µl
Denaturierte RNA	20,0 µl
	<u>50,0 µl</u>

3.5.2 Reverse Transkription - quantitative PCR

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels der Reversen Transkriptase SuperScript™ II (Invitrogen).

In den Ansätzen (12 µl) wurden je 2 µg der in Wasser gelösten RNA mit 0,2 µl Random Hexamer Primern (3 µg/µl) (Invitrogen) und 1 µl NTP-Mix (10 mM) (Peglab) gemischt und mit RNase-freiem Wasser (Qiagen) auf 12 µl aufgefüllt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze im Thermocycler bei 65 °C 5 min erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen. Nach der Inkubation wurden die Ansätze auf Eis gekühlt und mit 4 µl 5 x Puffer (Invitrogen) und 2 µl DTT (0,1 M) (Invitrogen) versehen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 25 °C erfolgte eine Erhitzung auf 42 °C. Im Thermocycler (Biometra) wurden in die Ansätze jeweils 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl) (Invitrogen) pipettiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation von 50 min bei 42 °C im Thermocycler. Zum Stoppen der cDNA-Synthese wurde der Mix für 15 min auf 70 °C erhitzt.

3.6 Genexpressionsanalyse

3.6.1 Mikroarray

Prinzip

Das Prinzip der Mikroarraytechnologie besteht darin, Nukleinsäuren einer speziellen Sequenz mit Hilfe der Eigenschaft der selektiven komplementären Bindung nachzuweisen. Die Chip-Technologie bietet die Möglichkeit, langwierige Analysevorgänge durch extreme Synchronisierung zu verkürzen. Trägermatrix des verwendeten Expressionsarrays ist Glas, auf welches cDNA-Sequenzen (Oligonukleotidsequenzen) aufgebracht sind. Jede der spezifischen Oligonukleotidsequenzen repräsentiert generell ein Gen. Die Synthese der einzelnen Sequenzen für die Konstruktion eines Mikroarrays setzt voraus, dass die Sequenzen aller Gene des Organismus bekannt sind. Die Oberfläche von glasbasierten Mikroarrays zeigt eine sehr geringe Eigenfluoreszenz, was den Einsatz von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. Mit diesem System können dann zwei zu vergleichende Proben parallel auf einem Mikroarray hybridisiert werden. Der in dieser Arbeit eingesetzte *Campylobacter jejuni*-Komplettgenom-Chip (MWG) ist mit zusätzlichen Arabidopsis-Kontroll-Oligonukleotiden ausgestattet.

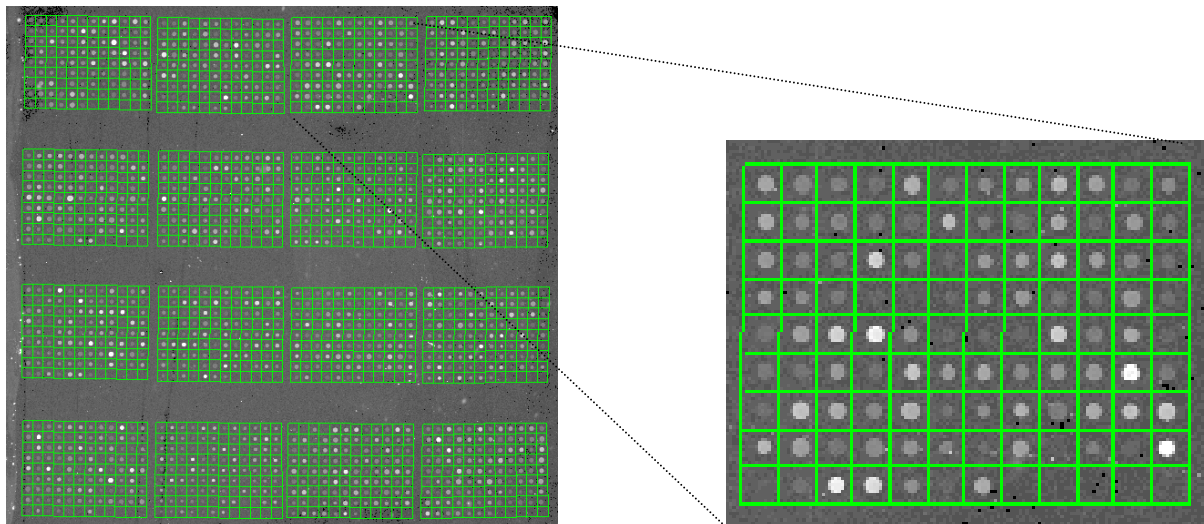


Abbildung 8: Beispiel des *C. jejuni*-Mikroarray-Chips mit sichtbar gemachter Rasteranordnung (eigene Aufnahme mittels Jaguar 2.0, Affymetrix)

Um die an den Sonden des Mikroarray gebundene cDNA detektieren zu können, muss sie vor der Hybridisierung markiert werden. Der Einbau Fluorochrom-modifizierter Nukleotide erfolgt direkt während der Synthese des cDNA-Stranges (vgl. Kapitel 3.5.1).

Das Arrayfeld wird mit zwei unterschiedlich markierten Targets bestückt. Fluoreszenz-Signale auf dem Array zeigen nach dem Vergleich mit der Referenzbedingung (37 °C) an, welche Gene exprimiert bzw. reprimiert worden sind, wobei die Stärke der Fluoreszenzsignale der Menge an spezifisch gebundener cDNA entspricht. Abbildung 8 zeigt in einem Beispiel die sichtbar gemachte Rasteranordnung eines Mikroarray-Chips.

Tabelle 8: Angaben zum *Campylobacter jejuni* Kompletengenom-Chip (MWG Biotech AG)

Anzahl der Gene	1633 Gene von <i>C. jejuni</i>
Informationsquelle	NCBI
Probenlänge	50 mer
Anzahl der Oligonukleotide pro Gen	1
Totale Anzahl der Spots	1648
Arabidopsis-Kontroll-Oligonukleotide	16
Mikroarray-Fläche	1,8 x 1,8 cm

Um die Qualität der Experimente beurteilen zu können, sind Wiederholungen notwendig. Als Replikat wurde die Dye-Swap-Methode benutzt, das heißt es wurden Replikate mit gleichem RNA-Pool benutzt, dabei aber die Label vertauscht (technisches Replikat).

Hybridisierung

Durch eine effektive Hybridisierung werden komplementäre Nukleinsäuren korrekt gepaart und unspezifische Bindungen unterdrückt.

Die in einem Experiment zu vergleichenden cDNA-Proben wurden in 100 µl Hybridisierungspuffer (MWG) zusammengeführt und 3 min bei 95 °C im Thermoblock (Biometra) denaturiert und anschließend auf Eis platziert. Das Arrayfeld wurde mit dem Hybridisierungsansatz versetzt, abgedeckt und in einer Feuchtekammer im Wasserbad (Memmert) bei 42 °C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte ca. 16 h unter ständiger Bewegung.

Waschen

Durch das Waschen mit ansteigender Stringenz werden nicht ausreichend komplementäre Moleküle von dem Mikroarray-Chip entfernt. Die Stringenz der Waschlösungen steigt durch abnehmenden Salzgehalt der Lösung von einem zum anderen Waschschrift an. Durch SDS in der Waschlösung werden fehlgepaarte Stränge destabilisiert und schließlich abgetrennt. Es wurden drei verschiedene Waschlösungen verwendet:

Waschlösung 1: 150 ml 2 x SSC, 0,1% SDS

Waschlösung 2: 150 ml 1 x SSC

Waschlösung 3: 150 ml 0,5 x SSC

Die Waschlösungen wurden auf 30 °C im Wasserbad erwärmt und anschließend in Glasbehälter mit Objektträgerhalterungen (Roth) gefüllt. Der Chip wurde in der entsprechenden Lösung jeweils 5 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Trocknung erfolgte eine Zentrifugation (Eppendorf 5804R) des Objektträgers in einem Falcon-Tube (2 min, 1500xg).

Auswertung

Die Mikroarray-Chips wurden nach Einstellung der Pixelauflösung und Laserleistung mit dem 428™ Array Scanner (Affymetrix, USA) gescannt und die erhaltenen Rohdaten abgespeichert.

Die Umwandlung der rohen Messdaten in normalisierte Werte der Expressionsmatrix erfolgte mit dem Computerprogramm Jaguar 2.0 (Affymetrix). Für diese Nachbearbeitung musste auf einer sehr kleinen Fläche die exakte Abgrenzung eines Arrayfeldes zum benachbarten Feld möglich sein, die Hintergrundsignalintensität pro Feld (beispielsweise durch unspezifisch gebundene Targets) wurde subtrahiert.

Aus den Fluoreszenzintensitäten der beiden unterschiedlich markierten Targets wurden die Intensitätsratios rot/grün mittels des Auswerteprogrammes gebildet. Eine Ratio größer 1,5 bedeutete eine Intensitätszunahme (d.h. steigende Genexpression), eine Ratio von Eins unveränderte Intensitäten (d.h. keine Veränderung im Expressionslevel im Vergleich zu 37 °C), eine Ratio kleiner 1,5 ließ auf eine Intensitätsabnahme (d.h. Genrepression) schließen. Eine Intensitätszunahme entsprach demnach einem positiven Wert, eine Intensitätsabnahme gleichen Betrags wurde durch das negative Vorzeichen ausgedrückt. Bei Wiederholung des Mikroarrayexperimentes und dem Austausch der fluorochromen Farbstoffe, änderten sich die Vorzeichen entsprechend. Die Werte wurden in Tabellen auf

Grundlage der Einteilung des Genoms durch das Sanger Institut (2007) nach funktionellen Gruppen geordnet, um Trendbewegungen im Expressionslevel ganzer Funktionsebenen überblicken zu können.

Die Clusteranalyse wurde als weitere Möglichkeit der Gruppierung von Genen ähnlicher Expressionsdynamik angewendet. Dabei können zwei verschiedene Gene mit großem Korrelationskoeffizienten in einer Gruppe zusammengefasst werden (STURN et al., 2002). Die graphische Darstellung der Ergebnisse dieser Analyse erfolgt in Form eines als Dendrogramm bezeichneten Binär-Baums und wurde unter Verwendung der Genesis Software (Version 1.2) erstellt.

3.6.2 Quantitative PCR

Prinzip

Im Gegensatz zur klassischen PCR (Endpunktbestimmung) wird bei der Real-time PCR die Menge an amplifizierten Produkten zu jedem Zyklus gemessen. Der Zyklus, bei dem eine bestimmte Produktmenge überschritten wird (threshold cycle), steht im logarithmischen Verhältnis zur Ausgangsmenge. Die Detektion erfolgt durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green. Dieser Farbstoff ist nicht sequenzspezifisch und fluoresziert, sobald er an doppelsträngige DNA gebunden ist.

Die Spezifität des Produktes wird im Anschluss an die PCR durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Vorteile der Methodik finden sich vor allem in der Sensitivität und im schnellen Probendurchlauf in großem Umfang. Messung und Quantifizierung sind nach Beendigung der PCR-Reaktion abgeschlossen, so dass eine Kontamination durch Öffnen von Reaktionsgefäßen ausgeschlossen ist. Das Analyseverfahren weist eine hohe Reproduzierbarkeit und geringe Varianzen der Ergebnisse auf. Sie ist eine optimale Ergänzung zur Mikroarray-Technik und eignet sich zur Bestätigung von semi-quantitativen Quantifizierungsergebnissen aus Mikroarray-Experimenten. Die Real-time PCR dieser Studie erfolgte unter Nutzung des ABI Sequence Detections Systems ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Real-time PCR

Zur Vervielfältigung der bestimmten Sequenzabschnitte bzw. Genabschnitte kam der QuantiTect™ SYBR®Green PCR Kit (Qiagen) zum Einsatz. Es wurden folgende Volumina zunächst in einem Mastermix zusammengeführt und anschließend in die Vertiefungen einer 96 Well Optical Reaktion Plate (Applied Biosystems), wie in Tabelle 9 aufgelistet, pipettiert.

Tabelle 9: Pipettierschema für die quantitative PCR

Komponente	Volumen/Reaktion
2 x QuantiTect SYBR®Green PCR Master Mix*	12,5 µl
Primer A	Variabel (Tabelle)
Primer B	Variabel (Tabelle)
Rnase freies Wasser	Variabel
Template cDNA	0,5 µl
Gesamt-Volumen	<u>25 µl</u>

*Mastermix enthält: HotStar Taq™ DNA Polymerase, QuantiTect SYBR®Green PCR Puffer, dNTP-Mix, SYBR® Green I, ROX, MgCl₂

Die Platte wurde mit einer Folie (Optical Adhesive Cover Starter Kit, Applied Biosystems) abgeklebt, vorsichtig an zentrifugiert (5804R, Eppendorf) und in den Thermocycler gesetzt.

Die cDNA wurde nach folgendem Programm amplifiziert:

Initialer Aktivierungsschritt	15 min	95 °C	
Denaturierung	15 s	94 °C	} 40 Zyklen
Annealing	30 s	55 °C	
Elongation	30 s	72 °C	

Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Expressionsanalyse

Primeroptimierung

Die optimale Primerkonzentration der jeweiligen Assays wurde in Vorversuchen durch eine Primermatrixerstellung erarbeitet.

Die Auswahl der Primer für die zu untersuchenden Gene wurde mit der Software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) erstellt. Dabei wurde auf eine Amplikon-Länge von 50 bis 100 bp für eine optimale PCR-Effizienz geachtet. Alle verwendeten Oligonukleotidsequenzen wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

Zur Bestimmung der optimalen Primerkonzentration wurden in Vorversuchen verschiedene Primerkonzentrationen miteinander kombiniert (Tabelle 10). Die Primerkonzentration, die den geringsten C_T -Wert ergab, wurde für die weiteren Experimente eingesetzt.

Tabelle 10: Bestimmung der optimalen Primerkonzentration in der quantitativen PCR

Reverse Primer (nM)	Forward Primer (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

Standardkurvenerstellung

In der Standardkurve (C_T -Wert im Verhältnis zum Logarithmus der Verdünnungsstufe) ließ sich die Effizienz über die Steigung berechnen.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine serielle Verdünnung von fünf verschiedenen Konzentrationen an DNA durchgeführt. Die C_T -Werte wurden gegen die logarithmischen Verdünnungsstufen aufgetragen und somit wurde eine Standardkurve erstellt (Abbildung 9).

Die Effizienz lässt sich über die Steigung der Standardkurve ableiten und muss, um Werte miteinander vergleichen zu können, in allen Fällen gleich sein.

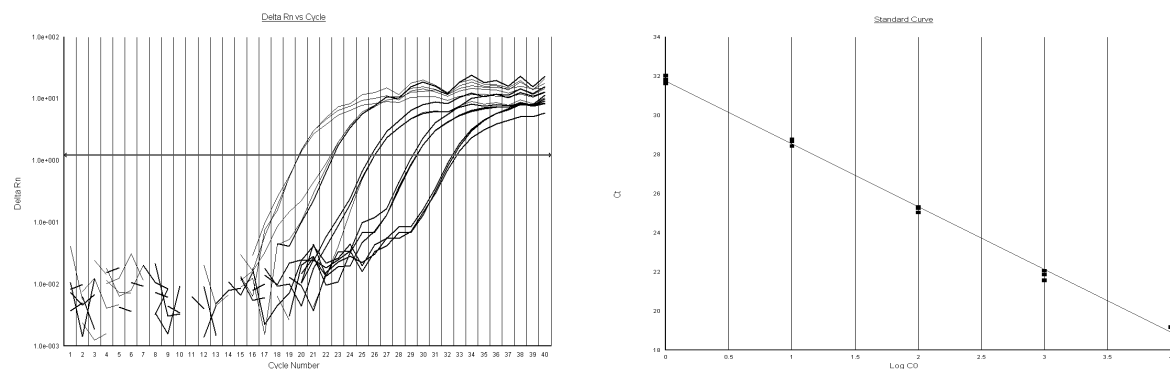


Abbildung 9: Erstellung von Standardkurven und Überprüfung der PCR-Effizienz am Beispiel von *groES*

Die Effizienz berechnet sich nach folgender Formel (PFAFFL, 2001):

$$\text{Effizienz} = 10^{-1/\text{Steigung}} - 1$$

*Steigung = Anstieg der Geraden = Slope

Für jedes Primerpaar, welches in der quantitativen PCR-Analyse eingesetzt wurde, erfolgte eine Primeroptimierung und eine Standardkurvenerstellung. Tabelle 11 listet alle verwendeten Primersequenzen in ihrer Konzentration auf.

Referenzgene

Ein Haushalts-Gen (*housekeeper*) muss unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen immer ein gleiches Expressionsverhalten zeigen. Somit ist es möglich, andere Gene, deren Expressionslevel sich innerhalb des Experimentes verändert, auf dieses Referenzgen zu normalisieren.

Zur Normalisierung der quantitativen Real-time PCR-Ergebnisse wurden zwei Haushalts-Gene genutzt. Für ausgewählte Sequenzen des 16S rRNA-Gens, dessen Protein ein essentieller Teil des ribosomalen Komplexes ist, und eines Genes des Thiaminstoffwechsels *thiC* (Stintzi 2003) erfolgte eine umfassende Validierung der Stabilität der Genexpression innerhalb eines Temperaturbereiches von 37 °C bis 50 °C. Die extrahierte RNA wurde nach vorheriger Messung im Spektrometer auf eine einheitliche Konzentration eingestellt.

Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung beschreibt den Vergleich der Expression des Zielgens mit der eines Referenzgens (Haushalts-Gen) unter Einbezug einer Kalibratorbedingung. Die Expressionsdaten lassen nach Normalisierung auf das Haushalts-Gen auf die relative Menge an mRNA und somit auf die Expressionsintensität von Zielgenen schließen.

Mittels der $\Delta\Delta C_T$ Methode können nach Ermittlung der PCR-Effizienzen mittels Standardkurven relative Werte berechnet werden.

Die relative Menge an mRNA lässt sich nach PFAFFL (2001) über die $\Delta\Delta C_T$ Methode berechnen:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{gewählte Bedingung}) - \Delta C_T (\text{Kalibratorbedingung})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \underline{\text{Ratio}}$$

Kalibrator (37 °C-Probe) und Referenzgene (16S rRNA -Gen, *thiC*) wurden wegen Interassay-Varianzen auf jeder Platte mitgeführt.

Tabelle 11: verwendete Primerpaare in der quantitativen PCR

Gen	Oligonukleotidsequenzen der Primerpaare		Amplifizierte		
			Fragment- länge (bp)	T _m des Produktes (°C)	Primer- konzentration (nM)
<i>cbpA</i>	5'- TCA GTA TGA CCA ATA CGG CGA T -3'	5'- CGT CCA AAT TTA CCC CAC CA -3'	85	73,6	300:900
<i>cjpb</i>	5'- GAC TCT TAG GTG CGC CTC CA -3'	5'- GCT CTC CAC CTT CTT CAT GTC CT -3'	50	75,0	900:900
<i>dnaJ</i>	5'- TAA GCA ATG ATG AAA AGC GAG C -3'	5'- ACC TGA GCT ACT AGA ACC AAA TCC A -3'	85	73,8	300:900
<i>dnaK</i>	5'- CCA ATT CTT GTG TTG CTG TGT ATG -3'	5'- TTG GGA TTA CTT TGC TCT CGC -3'	50	74,1	300:900
<i>groEL</i>	5'- AAG TAG CGA GTA AAA CAG CTG ATC AA -3'	5'- CGT TGC AGT AGT TGT TCC ATC G -3'	52	75,0	300:900
<i>groES</i>	5'- AAA TGG TGA TAA AAT CGT GTT TGC T -3'	5'- AAG TTT AAT TTC TGT TCC ACC GTA TTT AG -3'	51	72,6	300:900
<i>gryE</i>	5'- AAG TGC TAT GGC TTA TGC AAA TGA -3'	5'- ACA TTA ACA GCT GCT TCT AAA GCA TC -3'	80	73,7	300:300
<i>hrcA</i>	5'- CTT AGC GAT GAG GGT TTG ATC AC -3'	5'- TTT TGC CAA TAA TTT TGC ATC GT -3'	85	73,2	300:50
<i>hspR</i>	5'- CCT GTA TAT TTA ATC AGT GTT GTG GCT AA -3'	5'- CAT CGG TTC TAC TTG GCT CTA TCA AT -3'	102	74,3	300:50
<i>hspG</i>	5'- AGC AAC CTT AGT TTT AAA TAT GGC AAA -3'	5'- TCC ACT CCC ATA CCT TCG CT -3'	51	70,3	900:900
<i>rpod</i>	5'- GCA AAA GGA AGA ATG GCA AAA T -3'	5'- TCT AAG AAA GGC AGA CCA CGA TT -3'	85	75,3	900:300
<i>sclhA</i>	5'- TGC GCG TGC TAT AGA AAC AGA -3'	5'- AAG TCC CTC GCC ATA ACC TCT AC -3'	54	74,1	300:300
<i>thiC</i>	5'- TTG CGT CCT GGC TCT ACT CA -3'	5'- TTC TGA AAT TTG TGC CCC ATC -3'	50	75,2	300:300
<i>tig</i>	5'- AAA AGT TCC TGT AAG TGC CGT ACT TAA -3'	5'- CAT CTT GAG TGA GCT CTC TTT CAT ATC TT -3'	55	70,3	300:900
16S rRNA	5'- CCT AAG GAA TAA GCA CCG GCT AA -3'	5'- ACG CTT GCA CCC TCC GTA T -3'	62	80,2	300:50

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsbedingungen

Die quantitative und semiquantitative Ermittlung von Genexpressionen mittels Real-time PCR und Microarray setzte umfangreiche Arbeiten zur Optimierung der Versuchsbedingungen voraus.

4.1.1 Wachstum

Zur Ermittlung eines optimalen Kulturansatzes mit einer optimalen RNA-Ausbeute wurde parallel zu den RNA-Extraktionen eine Wachstumskurve für den Referenzstamm *C. jejuni* NCTC 11168 erstellt. In Abbildung 10 ist bei einer Inkubationsdauer des Kulturansatzes von 5 h bis 17 h eine qualitativ hochwertige RNA zu erkennen. Die RNA-Extraktion fand in der Mitte der exponentiellen Phase statt.

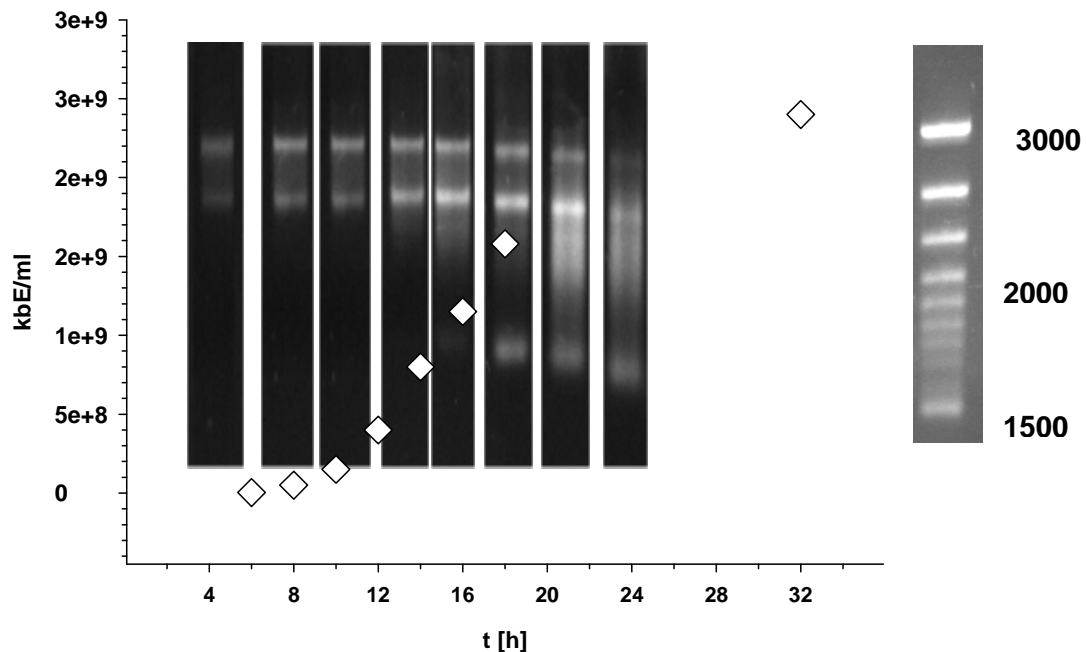


Abbildung 10: Wachstumskurve von *C. jejuni* NCTC 11168 bei 37 °C und paralleler RNA-Extraktion

4.1.2 Test von Haushalts-Genen auf ihre Eignung

Zur Überprüfung der Expression von Haushaltsgenen in *C. jejuni* wurden zwei Gene selektiert und Hitze gestresst. Die kodierenden Gene für 16S rRNA und *thiC* wurden für die Evaluierung der Methode gewählt.

- A) Das Protein der 16S rRNA ist als Untereinheit ein essentieller Bestandteil des ribosomalen Komplexes. In prokaryotischen Zellen ist die rRNA-Konzentration der limitierende Schritt in der ribosomalen Synthese. Die Konzentration der Ribosomen in der Zelle ist proportional zur totalen Proteinsynthese und somit zum totalen zellulären Metabolismus (VANDECASTEELE et al., 2001). Es zeigt sich eine klare Beziehung zwischen dem physiologischen Status der Bakterienzelle und der Menge an 16S rRNA (WURMBACH et al., 2001).
- B) Das *thiC* Gen ist ein Bestandteil des Thiaminstoffwechsels (Sanger Institut, 2007). In der Literatur wird es von STINTZI (2003) als ein Gen mit konstantem Genexpressionsmuster beschrieben.

Die Expressionsprofile beider Gene nach einem Hitzeschock während der exponentiellen Wachstumsphase sind in den Abbildungen 11 dargestellt. Nach einem Hitzeschock von 42 °C bis 50 °C zeigen sich die Expressionen von 16S rRNA und *thiC* stabil. Nach statistischer Prüfung der Expressionsdaten mittels Varianzanalyse und Bonferoni-Test waren nur marginale, nicht signifikante Unterschiede in der Expression von 16S rRNA ($p=0,854$) und *thiC* ($p=0,427$) unter den verschiedenen Temperatur- und Zeitbedingungen erkennbar.

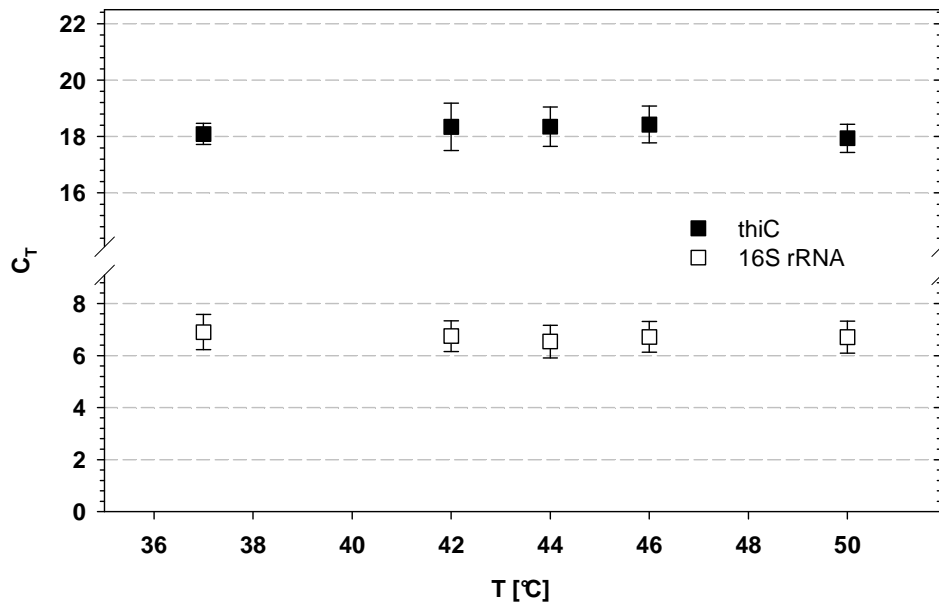


Abbildung 11: Prüfung der Stabilität von Haushaltsgenen [n=12]

Das Konfidenzintervall für die Haushaltsgene 16S rRNA liegt zwischen 6,56 und 6,87. Für *thiC* beträgt das Konfidenzintervall 18,06 bis 18,42.

Der Ribosomengehalt der Zelle und somit das basale Niveau der Genexpression der 16S rRNA liegt, physiologisch bedingt, höher als das anderer Gene. Dies führt zu einer frühen Detektion von 16S rRNA in der Real-time PCR-Analyse. Da es einen zeitlichen Unterschied zur Signalerkennung des Zielgens gibt, kommt es zu einer gewissen Verzerrung der Ergebnisse. Die C_T -Werte von *thiC* dagegen liegen im Detektionsbereich der Zielgene. Somit erfüllt *thiC* die Voraussetzung der Hitzestabilität und liegt mit seinem Expressionslevel im Detektionsbereich der Zielgene. Das Stoffwechselgen *thiC* wurde daher zur Normalisierung der Werte innerhalb der relativen Quantifizierung der Zielgene herangezogen.

4.1.3 Effizienzanalyse der Real-time PCR

Eine annähernd 100%ige Effizienz der Reaktion sichert die optimale Ergebnisfindung in der Relativen Quantifizierung mittels Real-time PCR und wird damit zur Voraussetzung der Etablierung des Experimentes. In Tabelle 12 sind die berechneten Effizienzen für alle in der relativen Quantifizierung verwendeten Gene aufgeführt.

Tabelle 12: Amplifikations-Anstieg, PCR-Effizienzen und Korrelationskoeffizienten für die individuellen Real-time PCR-Assays

Gen	Anstieg*	PCR-Effizienz in %	Korrelationskoeffizient
<i>cbpA</i>	-3,80	83	0,995
<i>clpB</i>	-3,50	93	0,997
<i>dnaJ</i>	-3,47	94	0,997
<i>dnaK</i>	-3,60	90	0,997
<i>groL</i>	-3,35	99	0,996
<i>groS</i>	-3,21	100	0,997
<i>grpE</i>	-3,45	95	0,976
<i>hrcA</i>	-3,23	100	0,953
<i>hspR</i>	-3,00	100	0,984
<i>htpG</i>	-3,32	100	0,994
<i>rpoD</i>	-2,91	100	0,993
<i>sdhA</i>	-3,48	94	0,994
<i>thiC</i>	-3,27	100	0,993
<i>tig</i>	-3,50	93	0,998
16S rRNA	-3,37	98	0,989

*negatives Vorzeichen durch fallende Gerade bei der Standardkurvenerstellung (vgl. Abbildung 9)

4.2 Untersuchung der Hitzeschockantwort auf physiologischer Ebene

4.2.1 Zellschäden infolge eines Hitzeschocks

Aus den Abbildungen 12 (A-F) geht hervor, dass Zellschädigungen bzw. ein beginnendes Absterben von *C. jejuni*-Zellen erst bei einer Temperatur von 50 °C eintreten. Auch bei einem Hitzestress von 52 °C konnten noch lebende, physiologisch nicht geschädigte Zellen mit Hilfe des LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit visualisiert werden.

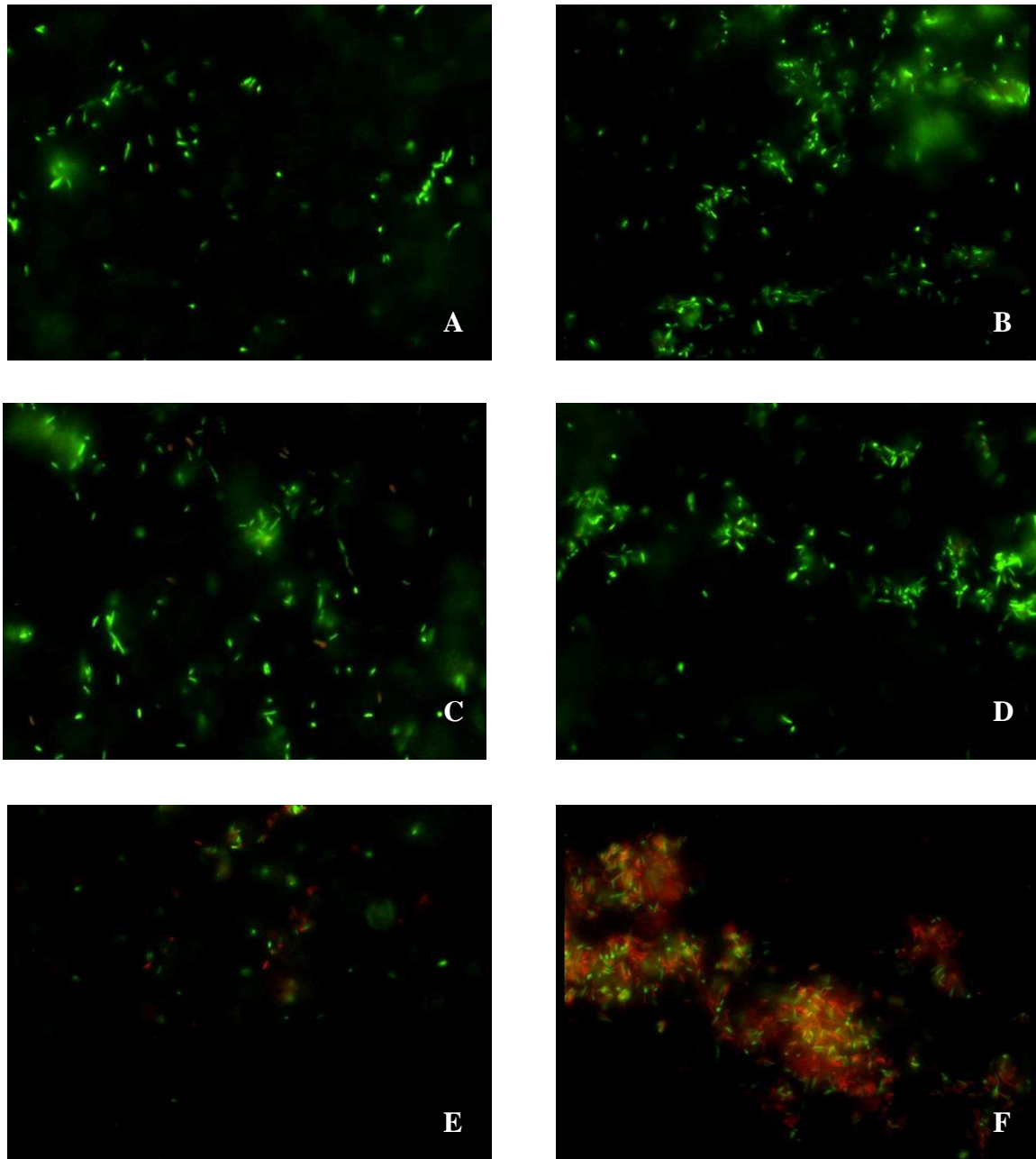


Abbildung 12: *C. jejuni* NCTC 11168 nach 10 min Hitzestress.

A) 42 °C B) 44 °C C) 46 °C D) 48 °C E) 50 °C F) 52 °C

Unter Nutzung zweier Farbstoffe werden tote und lebende Zellen verschieden angefärbt und können somit unterschieden werden. Der grün fluoreszierende Farbstoff Synto 9 färbt alle Zellen an, Propidiumiodid dagegen färbt ausschließlich Zellen mit geschädigter Membran unter dem Fluoreszenzmikroskop rot.

4.2.2 Hitzestress und Keimzahlen

Die Genexpressionsanalysen sollten bei einem Temperaturstress durchgeführt werden, welcher zum einen eine möglichst deutliche Änderung im Expressionsmuster von *C. jejuni* zeigt, zum anderen jedoch noch keinen drastischen Abfall in der Keimzahl (d.h. noch keine subletale Schädigung der Zellen) hervorruft.

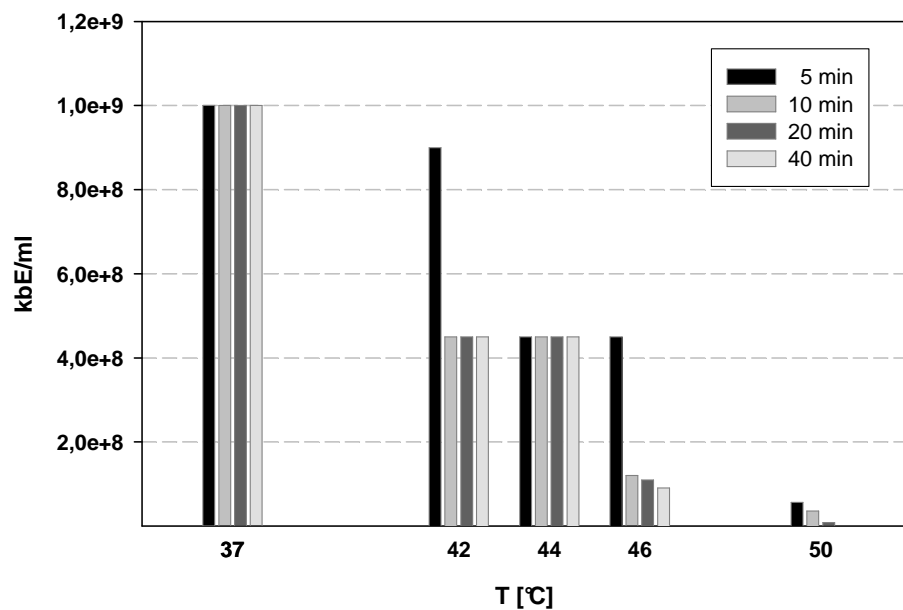


Abbildung 13: Keimzahlen von *C. jejuni* NCTC 11168 unter Hitzestress

Die Auswertungen der Keimzählungen zeigen einen Hitzestress von 46 °C als geeignet für die Genexpressionsanalyse. Bei einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 46 °C ist ein beginnender Abfall der Keimzahl während verschiedener Inkubationszeiten sichtbar (Abbildung 13) und ist der oberen physiologischen Wachstumsgrenze von *C. jejuni* gleichzusetzen.

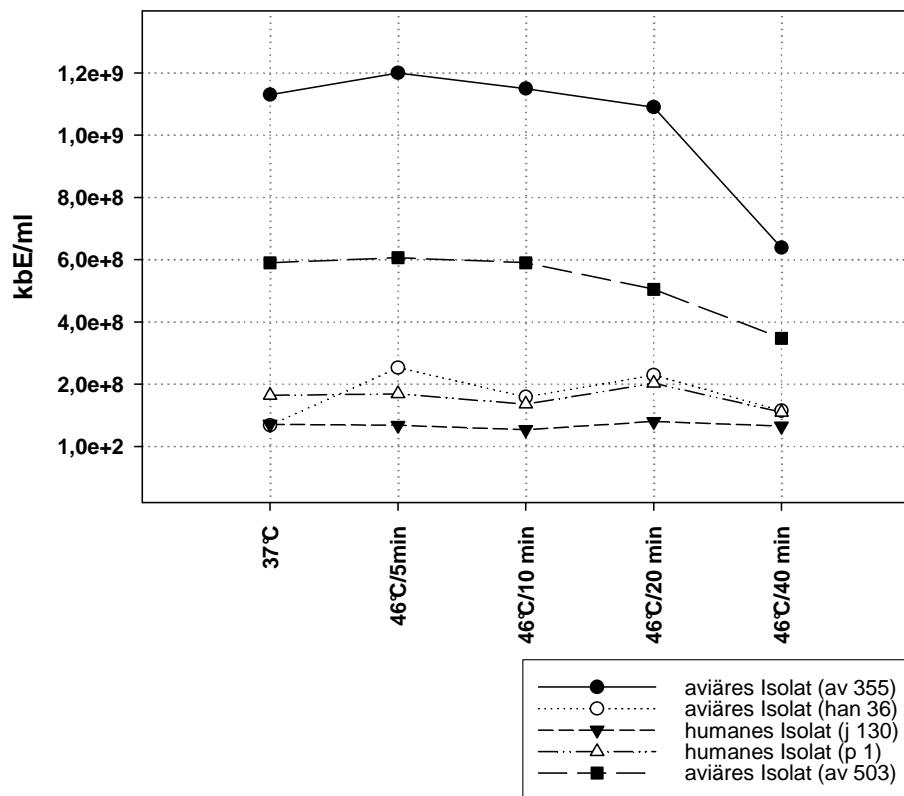


Abbildung 14: Keimzahlen aviärer und humaner *C. jejuni*-Stämme unter Hitzestress

Abbildung 14 zeigt die Auswertung der Keimzählung fünf ausgewählter *C. jejuni*-Stämme, welche einem Hitzestress von 46 °C ausgesetzt wurde. Dieser Versuch zur Prüfung einer differentiellen Stresstoleranz verschiedener *C. jejuni*-Isolate (vgl. Tabelle 3 S. 29) zeigt keine signifikanten phänotypischen Unterschiede im Stressverhalten der verschiedenen Stämme ($p \leq 0,05$).

4.3 Untersuchung der Genexpression von *C. jejuni*

4.3.1 Auswertung der Mikroarray-Daten

Allgemeine Übersicht über die Hitzeschockantwort bei 46 °C

Um einen umfassenden Einblick in die Hitzeschockantwort von *C. jejuni* zu erhalten, wurde eine globale Genexpressionsanalyse mittels Kompletengenom-Mikroarrayanalyse durchgeführt. Wie in Vorversuchen ermittelt, stellt ein Temperaturanstieg von 37 °C auf 46 °C einen milden Hitzestress ohne eine physiologische Schädigung für den

Mikroorganismus dar. Dabei wurde das Augenmerk auf die Analyse von Genexpressionsmustern stark exprimierter Transkripte gerichtet. Schwach exprimierte Transkripte konnten hierbei nur grob eingegrenzt werden. Für jede Versuchsbedingung wurde ein technisches Replikat (dye swab) angefertigt und getestet. Unterschiede im Expressionslevel von $\geq 1,5$ wurden als „Änderung der Expression festgelegt. Werte von $\leq 1,5$ wurden als „keine Änderung im Expressionslevel“ bewertet.

Zur globalen Genexpressionsanalyse von *C. jejuni* bei einem Hitzestress von 46 °C wurden Inkubationszeiten von 5 min, 10 min und 20 min gewählt. Dazu wurden jeweils 2 Mikroarray-Chips analysiert und ausgewertet. Anhand der funktionellen Klassifizierung von *C. jejuni* durch das Sanger Institut (2007) wurde eine Einteilung erarbeitet, welche die im Genom enthaltenen 1657 Gene in 17 funktionelle Gruppen zusammenfasst. Eine detaillierte Gliederung sowie die dazugehörigen Rohdaten sind im Anhang zu finden.

Es lassen sich eindeutige Unterschiede in der globalen Genexpression von *C. jejuni* nach einem Temperaturschock von 46 °C über 20 min (bezogen auf 37 °C) feststellen (Abbildung 15 A-C). Der Organismus scheint Regulationsmechanismen zu bedienen, welche Gene verschieden regulieren und sich somit anpasst. Diese Adaptation an den Hitzeschock ist gut erkennbar: Nach 5 min werden Gene in überwiegender Zahl induziert, nach 10 min wird die Genexpression vorwiegend gehemmt, nur noch wenige Gene werden induziert, während sich nach 20 min annähernd ein Gleichgewicht zwischen der Anzahl an induzierten und reprimierten Genen einstellt.

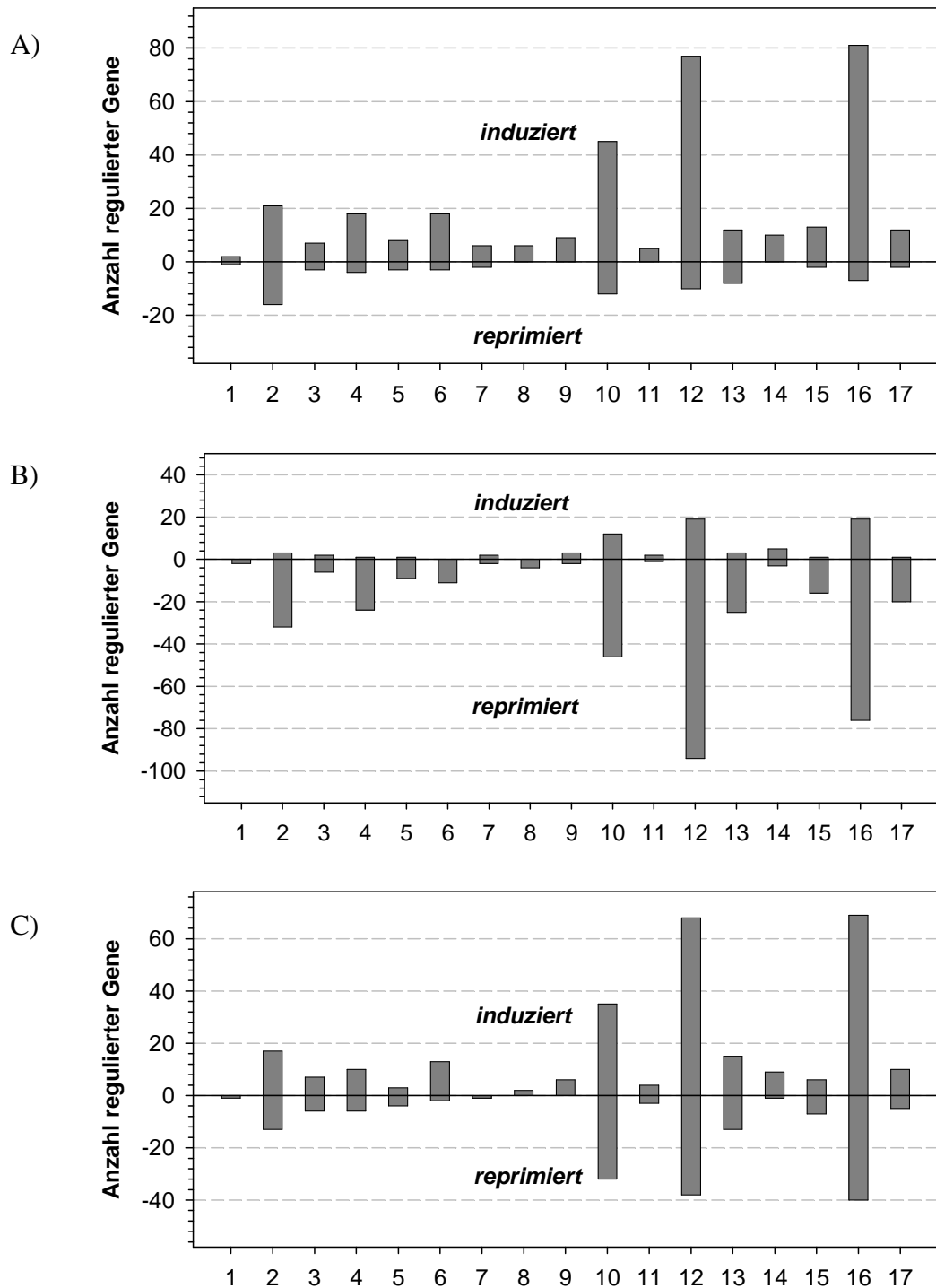


Abbildung 15: Genexpression von *C. jejuni* CCUG 11168 nach einem Hitzeschock von 46 °C [n=2]; A-5 min, B-10 min, C-20 min

(X-Achse: 1-Degradierung (Molekülmetabolismus), 2-Energiemetabolismus, 3-Zentraler intermediärer Metabolismus, 4-Biosynthese von Aminosäuren, 5-Purine, Pyrimidine, Nukleotide, Nukleoside, 6-Biosynthese von Co-Faktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern, 7-Fettsäuresynthese, 8-Regulatorische Funktionen, 9-Signaltransduktion, 10-Synthese und Modifikation von Makromolekülen, 11-Degradierung von Makromolekülen, 12-Zellentwicklung, 13-Zellprozesse/Transport, 14-Chaperone/ Hitzeschockproteine, 15-Zellprozesse/Andere, 16-Andere, 17-Unbekannte Funktionen (nach Sanger Center *C. jejuni* Datenbank))

Transkription infolge eines Hitzeschocks nach 5 min

Nach einem Hitzeschock von 37 °C auf 46 °C reagiert *C. jejuni* nach 5 min mit einer Erhöhung der Genexpression in allen Bereichen des Stoffwechsels. Dabei wird die Expression von Genen aller untergeordneten Funktionsbereiche des mikromolekularen Stoffwechsels, der Signaltransduktion und anderer Funktionen zu 26 % bis 38 % reguliert. Die Expression der Gruppe der Hitzeschockgene wird als Ausnahme zu fast 60 % reguliert. Alle anderen untersuchten Funktionsgruppen zeigten eine Regulation von 9 % bis 26 %. (Diese prozentuellen Angaben geben Auskunft über den Anteil der Gene, welche eine Änderung in der Expression $\geq 1,5$ bzw. $\leq 1,5$ zeigten, ohne eine Induktion bzw. Hemmung der Expression zu unterscheiden.)

Die Auswertung der Expressionsdaten zeigte, dass insgesamt lediglich 25 % aller angelegten Gene differentiell exprimiert wurde. Unter den 30 am höchsten induzierten Genen fanden sich zu einem großen Teil Gene, welche für die Zellentwicklung bzw. für Hitzeschockproteine kodieren, des Weiteren Gene, denen eine Funktion im makromolekularen Stoffwechsel und im Transport zugeschrieben wird. Unter den 30 am stärksten gehemmten Genexpressionen wurden vorrangig Gene des Energiemetabolismus, des Transportes, des Makromolekülmetabolismus und anderer Funktionen gruppiert. Auffällig daran war, dass unter den reprimierten Genen mit einer großen Ratio hauptsächlich Enzyme waren.

Transkription infolge eines Hitzeschocks nach 10 min

Nach einem Hitzestress von 37 °C auf 46 °C wird nach 10 min die Expression vieler Gene im Organismus von *C. jejuni* überwiegend gehemmt.

Gene, deren Funktionen dem Mikromolekülmetabolismus (vgl. Tabelle 14, Anhang) zugeordnet werden, werden zum einen in einem geringeren Umfang reguliert, zum anderen wird ihre Expression zunehmend gehemmt. In der funktionellen Gruppe der Gene der Biosynthese von Aminosäuren konnte keine Induktion einer Genexpression mehr detektiert werden. Während nach einem Hitzeschock von 5 min noch 26 % bis 38 % des mikromolekularen Stoffwechsels auf Expressionsebene reguliert wurden, sind es nach 10 min nur noch 17 % bis 32 %. Die Gruppe der Hitzeschockproteine stellt weiterhin die am stärksten regulierte Gruppe (~50 %) dar. Die Gene, deren Funktion noch unbekannt ist, sowie Gene, denen eine Funktion in der Zellentwicklung, im Transport, in Zellprozessen und Anderen zugeschrieben wird, werden im Vergleich zu einem Hitzeschock nach 5 min

vermehrt reguliert (d.h. mit einer Änderung der Expression von $\geq 1,5$ bzw. $\leq 1,5$ im Vergleich zu 37 °C gemessen).

Im Bereich des Makromolekülmetabolismus kommt es zu einer Verschiebung der Expression. Die Anzahl der regulierten Gene bleibt annähernd gleich, die Expression wird jedoch zu einem großen Teil gehemmt. Trotzdem stellt dieser Funktionsbereich die größte Gruppe an induzierten Genen dar. Deshalb finden sich unter den 30 am stärksten induzierten Genen neben Chaperonen hauptsächlich Gene, welche für periplasmatische Proteine, Membranproteine und Lipoproteine kodieren. Auffällig hierbei war die hohe Zahl von Genen mit hypothetischen Funktionszuweisungen. Auch im Funktionsbereich der Signaltransduktion und der Synthese und Modifikation von Makromolekülen wurden hohe Expressionslevel gemessen.

Ähnlich wie nach einem Hitzeschock nach 5 min finden sich besonders stark reprimierte Gene aus der Gruppe der Makromoleküle, Transportproteine und Andere, jedoch nun auch Gene, welche für Proteine der Zellentwicklung und Zellprozesse kodieren und hauptsächlich enzymatische Funktionen haben.

Transkription infolge eines Hitzeschocks nach 20 min

20 min nach Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 46 °C steigt das Transkriptionslevel von Genen, welche mit der Regulation des mikromolekularen Stoffwechsels in Zusammenhang gebracht werden an. Gene des Energiemetabolismus und der Synthese von Aminosäuren, Purinen, Pyrimidinen, Co-Faktoren, prosthetischen Gruppen u. a. werden vom Mikroorganismus wieder verstärkt transkribiert. In allen weiteren Bereichen des Stoffwechsels lässt sich eine Zunahme der Expression von Genen beobachten. Gene, welche für den Zellschutz, Membranschutz und die Synthese von Makromolekülen stehen, werden neben Hitzeschockproteinen weiterhin mit stark erhöhter Rate induziert. Gemessen an der Zahl der reprimierten Gene bleibt auch nach 20 min Hitzeschock die Expression von Genen der Zellentwicklung, des makromolekularen Stoffwechsels und unbekannter Funktionen in großem Umfang gehemmt, im Vergleich zur Inkubationszeit von 10 min jedoch vermindert.

Auch hier haben die Proteine der stark reprimierten Gene, wie auch unter den voran beschriebenen Inkubationszeiten, eine enzymatische Funktion im Stoffwechsel.

Die Auswertung der Expressionsdaten über die gewählten drei Zeitpunkte zeigt deutlich, dass nach 20 min Stressoreinwirkung das Bakterium sich durch globale Regulation seiner Genexpression an die Stressbedingungen angepasst hat.

Hitzeschockgene

Die Chaperone *grpE*, *dnaJ*, *dnaK*, *hrcA*, *groES* und *groEL* gehören zu den am stärksten induzierten Genen infolge eines Hitzeschocks im Mikroarray-Experiment. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Ratio (Faktor der Änderung, *fold change*).

TABELLE 13: Hitzeschockgene und ihre Ratio unter einem Hitzestress von 46 °C (bezogen auf 37 °C)

Hitzeschockgen	Ratio*
<i>grpE</i>	9,39
<i>hrcA</i>	8,29
<i>groES</i>	4,54
<i>groEL</i>	4,18
<i>dnaJ</i>	4,07
<i>cbpA</i>	3,83
<i>clpB</i>	2,77
<i>dnaK</i>	3,30

* Daten repräsentieren die höchste Ratio aus 5 min, 10 min, 20 min.

Diese und weitere werden im Real-time Experiment verifiziert.

Vergleich aviärer und humaner Isolate

Von zwei aviären Isolaten wurde eine Kompletengenomanalyse mittels Mikroarray wie beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse stehen im Vergleich zu dem Referenzstamm *C. jejuni* NCTC 11168 als humanes Isolat. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, gleichen sich die Expressionsmuster sowohl nach 10 min, als auch nach 20 min Hitzeschock (46 °C). Unterschiede sind dabei nicht signifikant. Differenzen treten teilweise durch eine schlechtere Auswertbarkeit von Mikroarray-Chips, welche mit der cDNA aviärer *C. jejuni*-Isolate hybridisiert wurden, auf. (Auf dem verwendeten Mikroarray-Chip sind Gen-Sequenzen von *C. jejuni* NCTC 11168 gespottet – aufgrund von Stammesdiversitäten und variablen Heterogenitäten im Genom kann es zu einem differenten Hybridisierungsergebnis kommen.) Ergebnisse der untersuchten *C. jejuni*-Stämme Han36, P1 und J130 konnten wiederholt nur sehr schlecht ausgewertet werden. Die entsprechenden Daten waren für einen Vergleich mit anderen Stämmen, aufgrund einer zu gering auswertbaren Spotanzahl, nicht ausreichend.

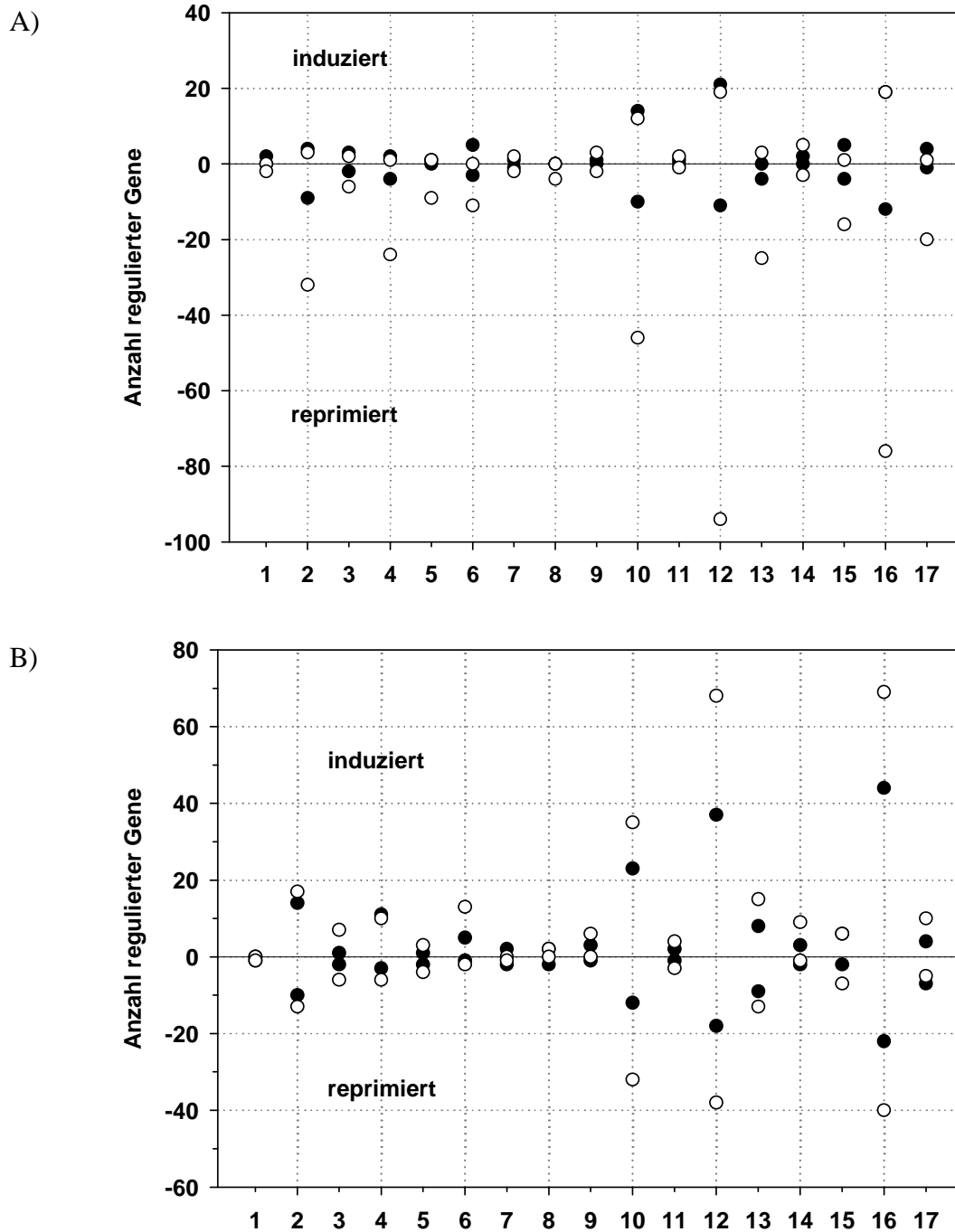


Abbildung 16: Vergleich von humanem Isolat *C. jejuni* NCTC 11168 (○) und aviären Isolaten *C. jejuni* (●) nach einem Hitzeschock von 46 °C [n=2]

A) nach 10 min mit *C. jejuni* av 305; B) nach 20 min mit *C. jejuni* av 355

X-Achse: 1-Degradierung (Molekülmetabolismus), 2-Energiemetabolismus, 3-Zentraler intermediärer Metabolismus, 4-Biosynthese von Aminosäuren, 5-Purine, Pyrimidine, Nukleotide, Nukleoside, 6-Biosynthese von Co-Faktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern, 7-Fettsäuresynthese, 8-Regulatorische Funktionen, 9-Signaltransduktion, 10-Synthese und Modifikation von Makromolekülen, 11-Degradierung von Makromolekülen, 12-Zellentwicklung, 13-Zellprozesse/Transport, 14-Chaperone/ Hitzeschockproteine, 15-Zellprozesse/Andere, 16-Andere, 17-Unbekannte Funktionen (nach Sanger Center *C. jejuni* Datenbank)

Clusteranalyse der Mikroarraydaten

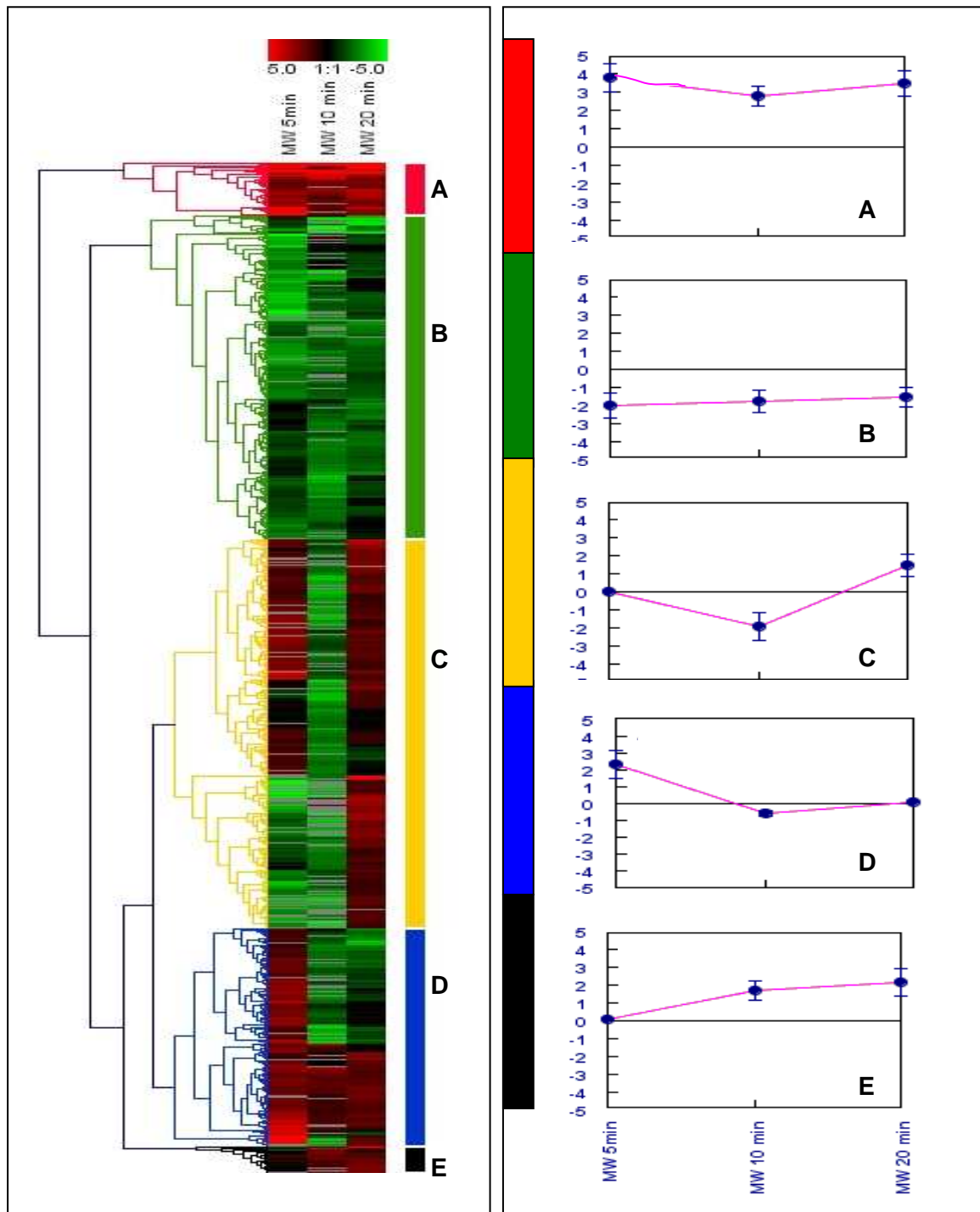


Abbildung 17: Hierarchische Gruppierung regulierter Gene von *C. jejuni* NCTC 11168 infolge einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 46 °C [n=2]

Initial repräsentiert jede einzelne Zeile die Genexpression eines Gens und jede Säule die Genexpression bei einem individuellen Zeitpunkt der Temperaturerhöhung. Das jeweilige Profil der Genexpression jedes Clusters ist logarithmisch dargestellt.

Mittels der Clusteranalyse lassen sich Gene mit gleicher Änderung der Expression darstellen und gruppieren. In den Auswertungen der einzelnen Inkubationszeiten in den Mikroarray-Experimenten konnten bereits die Gene mit sehr starker Induktion bzw. starker Hemmung der Expression identifiziert werden. Ein Vergleich des Expressionsverhaltens der verschiedenen Gene über den gesamten Inkubationszeitraum erschien sinnvoll, um einen Überblick über Regulationsstrategien zu erhalten. Dabei werden die Expressionsdaten so geordnet, dass ähnliche Expressionsprofile in Gruppen (Cluster) zusammengefasst werden. Fünf solcher Cluster wurden ermittelt und diese repräsentieren fünf verschiedene Expressionsprofile. Jedes dieser Expressionsprofile (A, B, C, D, E) ist in einer eigenen Graphik abzulesen (Abbildung 17). Ein Vergleich dieser zeigt, dass die Cluster A, D und E die Expressionsprofile von Genen enthalten, deren Expression induziert bzw. aktiviert wird. Während die Cluster B und C Gene zusammenfassen, deren Expression infolge eines Hitzeschocks von 37 °C auf 46 °C gehemmt wird. Weit erhin wird deutlich, dass der Mikroorganismus über ein großes Regulationspotential verfügt, dies zeigen zum einen die Auswertungen der Anteile tatsächlich regulierter Gene im Vergleich zu den generell vorhandenen Genen, zum anderen die different ermittelten Expressionsstärken verschiedener Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Cluster A enthält Gene, deren Expression sehr stark über den gesamten Inkubationszeitraum von 5 bis 20 min induziert wird. Diese Gruppe repräsentiert vor allem Hitzeschockgene und Gene, deren Proteine für die ribosomale Proteinsynthese und Modifikation kodieren.

Cluster B gruppiert Gene, deren Expression infolge des Hitzeschocks von 37 °C auf 46 °C gehemmt wird. Zu ihnen zählen Gene mit Funktionszuweisungen in der Aminosäuresynthese, Energiemetabolismus, DNA-Replikation, Zellentwicklung und Synthese von Makromolekülen.

In Cluster C gruppiert sich die größte Anzahl von Genen. Diese Gene zeigen auf einen 5 minütigen Temperaturstress folgend zunächst keine Änderung in ihrer Expression. Jedoch resultiert eine längere Inkubation (10 min) in einer zunehmenden Hemmung der Expression der Gene. Eine nochmals verlängerte Inkubation (20 min) bewirkt wiederum eine zunehmende Induktion der Expression dieser Gene. Zu ihnen zählen hauptsächlich Gene mit Funktionen für Oberflächenstrukturen, breite regulatorische Funktionen und DNA-Modifikation, Rekombination und Reparatur.

Cluster D gruppiert Gene, welche auf den Hitzestress von 46 °C folgend zunächst stark induziert werden (5min), deren Expression mit anhaltender Inkubationszeit jedoch zunehmend gehemmt wird bzw. keine Expressionsänderung im Vergleich zur Ausgangstemperatur von 37 °C mehr zeigt. In diesem Cluster finden sich vorrangig Hitzeschockgene und Gene, deren Proteine für die Proteintranslation und Modifikation, den Schutz von Membranen und Lipoproteinen, sowie für Oberflächenpolysaccharide kodieren.

Cluster E versammelt nur eine sehr kleine Gruppe von Genen, deren Expression mit zunehmender Inkubationszeit verstärkt induziert wird. Gene, deren Proteine für die Synthese und Modifikation von Makrometabolismus kodieren, sowie viele Gene mit unbekannten Funktionen sind in dieser Gruppe zu finden.

Eine weitere Clusteranalyse wurde zum Vergleich der aviären und humanen Stämme durchgeführt. Dabei zeigten sich kaum Unterschiede. Die Ergebnisse der Clusteranalyse mit NCTC 11168 können somit exemplarisch für *C. jejuni* dargestellt werden.

4.3.2 Relative Quantifizierung der Expression von 11 Hitzeschockgenen mittels Real-time PCR

Beschreibung der Expressionsdynamik unter Berücksichtigung der Inkubationszeit

Durch die Mikroarray-Analyse des *C. jejuni* Genoms wurde nach einem Hitzestress von 46 °C über einen Inkubationszeitraum von 5-20 min eine sehr starke Transkription der Hitzeschockgene *cbpA*, *clpB*, *dnaJ*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *grpE* und *hrcA* (vgl. Tabelle 13) gemessen. Das Experiment liefert jedoch nur eine semiquantitative Ermittlung der gesteigerten Induktionsraten. Diese Gene und weitere, deren Funktion als Hitzeschockgene beschrieben wird, wurden mittels Real-time PCR relativ quantifiziert. Dadurch sollten einerseits quantitative Daten zur Änderung der Expression gewonnen werden, andererseits sollten die Mikroarray-Analyse-Ergebnisse verifiziert werden.

Die Experimente zur Relativen Quantifizierung wurden wiederholt als Doppelansatz durchgeführt (2x2), wobei ein Doppelansatz als eine Einheit in der Berechnung und statistischen Auswertung betrachtet wurde. Im Folgenden (Abbildung 18 bis 21) wird für jedes der ausgewählten Gene das individuelle Expressionsmuster von 42 °C bis 50 °C aufgezeigt und ausgewertet. Hierbei wurde mit der Zweifaktoriellen Varianzanalyse, dem Bonferroni-Test und der Scheffé-Prozedur gearbeitet (SPSS 5, SPSS Software GmbH München). Die Messungen streuten normalverteilt um einen Mittelwert, der als Expressionslevel angenommen werden kann. Einer statistischen Prüfung wurden sowohl der Einfluss der Inkubationstemperatur, der Inkubationszeit, als auch die Interaktion der Inkubationstemperatur und Inkubationszeit, auf das Expressionsverhalten der Gene unterzogen.

Es wurde die Expression 11 ausgewählter Hitzeschockgene, eines Sigmafaktors (*rpoD*) und eines Stoffwechselgens (*sdhA*) untersucht. Dabei war eine basale Expression von Chaperonen und Hitzeschockgenen bei 37 °C nachweisbar.

Als auffällig erwies sich die Messung einer erhöhten Induktion der Expression von Hitzeschockgenen nach einem Temperaturanstieg von 37 °C auf 42 °C, obwohl eine

Temperatur von 42 °C als optimale Wachstumstemperatur von *C. jejuni* beschrieben wird. Eine weitere Temperaturerhöhung auf 44 °C resultierte jedoch in keiner signifikanten Erhöhung der Transkriptmengen der einzelnen Hitzeschockgene. Dagegen wurde bei 46 °C ein markanter Anstieg des mRNA-Levels aller Hitzeschockgene und *rpoD* ermittelt, mit Ausnahme von *htpG* und *sdhA*. Nach einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 50 °C wird nur noch die Induktion weniger Hitzeschockgene aufrechterhalten.

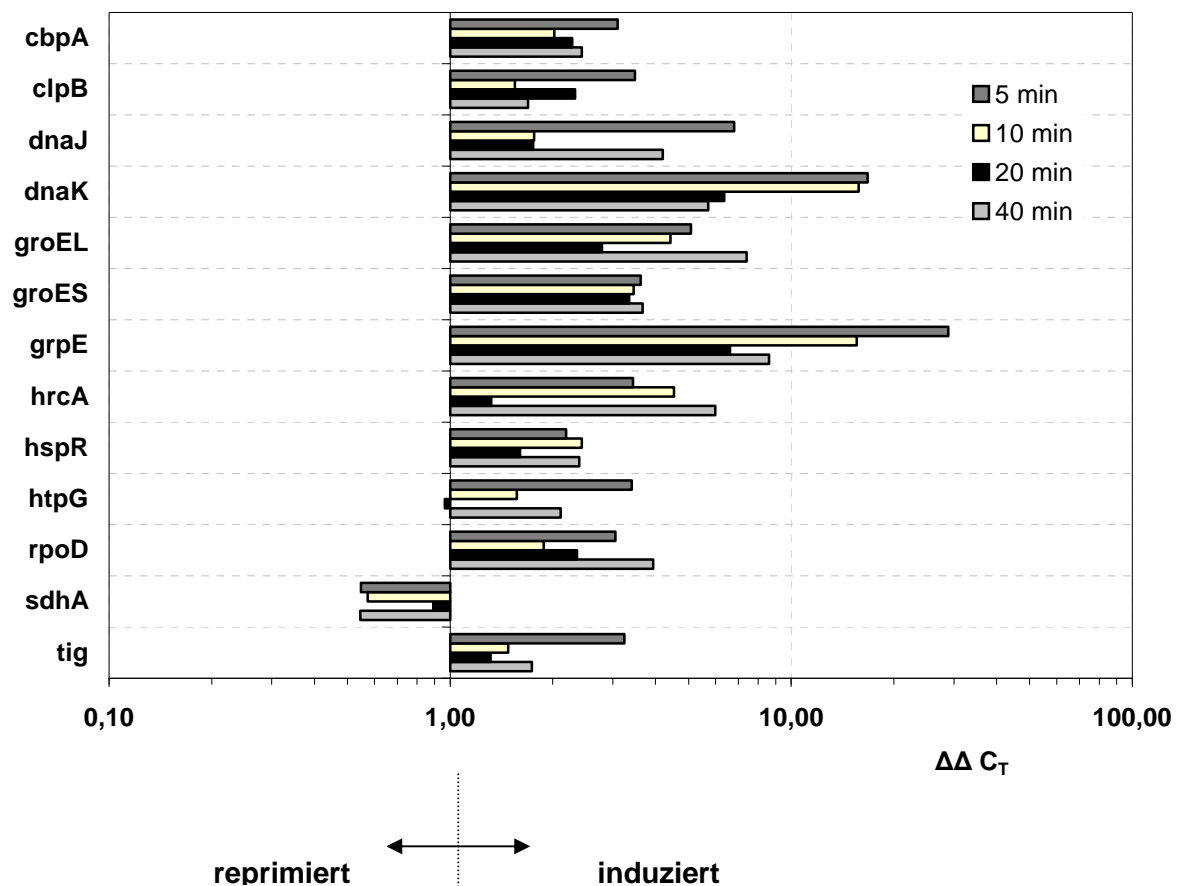


Abbildung 18: relative Quantifizierung 11 ausgewählter Hitzeschockgene, einschließlich eines Sigmafaktors (*rpoD*) und eines Stoffwechselgens (*sdhA*) mittels Real-time PCR nach einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 42 °C [n=4]

Gemessen an der höchsten Transkriptrate in einer der Inkubationszeiten bei einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 42 °C werden die Gene *cbpA*, *clpB*, *groES*, *hspR*, *htpG* und *tig* mit einer um ca. 2,4 bis 3,6fach erhöhten Expression von *C. jejuni* als Reaktion auf die Temperaturveränderung ähnlich induziert. Höhere Transkriptraten (> 5fache Erhöhung der Expression) werden bei der Genexpressionsanalyse von *dnaJ*, *dnaK*, *groEL*, *grpE* und *hrcA* gemessen, wobei *grpE* die stärkste Induktion der Expression (28,8fache) zeigt. Das Stoffwechselgen *sdhA* (Succinatdehydrogenase, Tricarbonsäurezyklus) wird in seiner Expression als Folge einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 42 °C gehemmt.

Ein Vergleich der verschiedenen Inkubationstemperaturen (42 °C, 44 °C, 46 °C) lässt eine unterschiedliche Expressionsdynamik der untersuchten Gene als Reaktion des Mikroorganismus auf Hitzestress erkennen. Darauf wird im Folgenden näher eingegangen. Die Abbildungen 18 bis 21 veranschaulichen dabei, gruppiert nach den Inkubationstemperaturen, die x-fache Änderung der Expression bezogen auf den Ausgangszustand von 37 °C. Normalisiert wurden die Werte auf das Haushaltsgen *thiC*.

Bezogen auf den Ausgangszustand bei 37 °C wird *cbpA* bei einer Temperatur von 42 °C, 44 °C und 46 °C relativ gleichmäßig, ohne signifikante Unterschiede exprimiert ($p > 0,050$). Es zeigt sich dabei kein Einfluss der Dauer des Hitzestresses auf das Expressionslevel.

Ähnlich erfolgt die Induktion der Expression von *c/pB* bei einem Hitzeschock von 42 °C, 44 °C, 46 °C (bezogen auf den Ausgangszustand bei 37 °C). Dabei spielt die Inkubationszeit keine signifikante Rolle ($p = 0,064$). Der Mikroorganismus reagiert auf eine Temperaturerhöhung von 37 °C auf 42 °C und 44 °C mit einer nahezu identischen Transkription von *c/pB*, dabei lassen sich nach 5 min die höchsten Induktionen beobachten. Das Genexpressionsmuster von *dnaJ* dagegen unterliegt signifikanten Schwankungen in den unterschiedlichen Temperaturbereichen ($p = 0,020$) und in den gewählten Zeitabstufungen ($p = 0,042$). Es zeigt sich weiterhin eine signifikante Interaktion zwischen Temperatur und Zeit ($p = 0,042$). Sehr hohe mRNA-Level von *dnaJ* wurden bei 42 °C und 46 °C gemessen. Bei einem Hitzeschock von 42 °C bis 46 °C ist ein wiederkehrendes Expressionsmuster erkennbar: Zunächst reagiert *C. jejuni* auf den Hitzestress nach 5 min mit einer erhöhten Expression von *dnaJ*. Das gemessene RNA-Level sinkt nach 10 min Temperaturstress, jedoch resultiert eine andauernde Inkubation (40 min) in einer wieder gesteigerten Transkription von *dnaJ*.

Dieses Reaktionsmuster zeigt auch die Regulation der Induktion der Expression des Sigmafaktors *rpoD* in Folge einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 42 °C bis 46 °C. Die Expression von *rpoD* wird mit dem höchsten Level jeweils nach 40 min induziert, bei *dnaJ* ebenfalls mit Ausnahme der Inkubation bei 42 °C, hier ist das gemessene Transkriptionlevel nach 5 min Inkubation eine höhere Induktion als nach 40 min.

Im Vergleich ihrer Expressionsmuster bei einem Hitzestress von 42 °C bis 46 °C zeigen *dnaK* und *grpE* ebenfalls eine Ähnlichkeit in der Dynamik ihrer Expression. Die höchste Induktion der Expression zeigt sich unter den jeweiligen Inkubationstemperaturen nach 5 min Temperaturstress. Eine längere Inkubation bis zu 40 min resultiert in keiner weiteren Erhöhung der Transkriptmengen. Dabei werden beide Hitzeschockgene sehr stark, jedoch *grpE* mit der höheren Transkriptionrate, induziert. Signifikante Schwankungen innerhalb der Temperaturbereiche zeigen sich bei *grpE* und *dnaK* lediglich bei 42 °C ($p = 0,027$ bzw. $p = 0,007$). Die Expression beider Gene blieb ohne einen Einfluss der Inkubationszeit.

Die Menge der detektierten mRNA von *hrcA* zeigt sich sowohl durch Inkubationstemperatur ($p = 0,002$), als auch durch die Inkubationszeit ($p = 0,008$) signifikant beeinflusst. Auffällig

zeigen sich hier im Genexpressionsmuster hohe Transkriptionslevel bei 10 min und 40 min. Die höchsten Expressionen von *hrcA* wurden bei einer Temperatur von 42 °C (bezogen auf 37 °C) gemessen. Mit steigender Inkubationstemperatur sinkt die Transkriptmenge von *hrcA*, was seiner vermuteten Funktion als Negativregulator entspricht. Die gemessenen Werte nach einer Inkubationszeit von 20 min weichen dabei ab. Möglicherweise ist dies auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen, denn weitere „Ausreißer“ zeigen die Auswertungen von *hspR* und *htpG* bei 20 min Hitzestress.

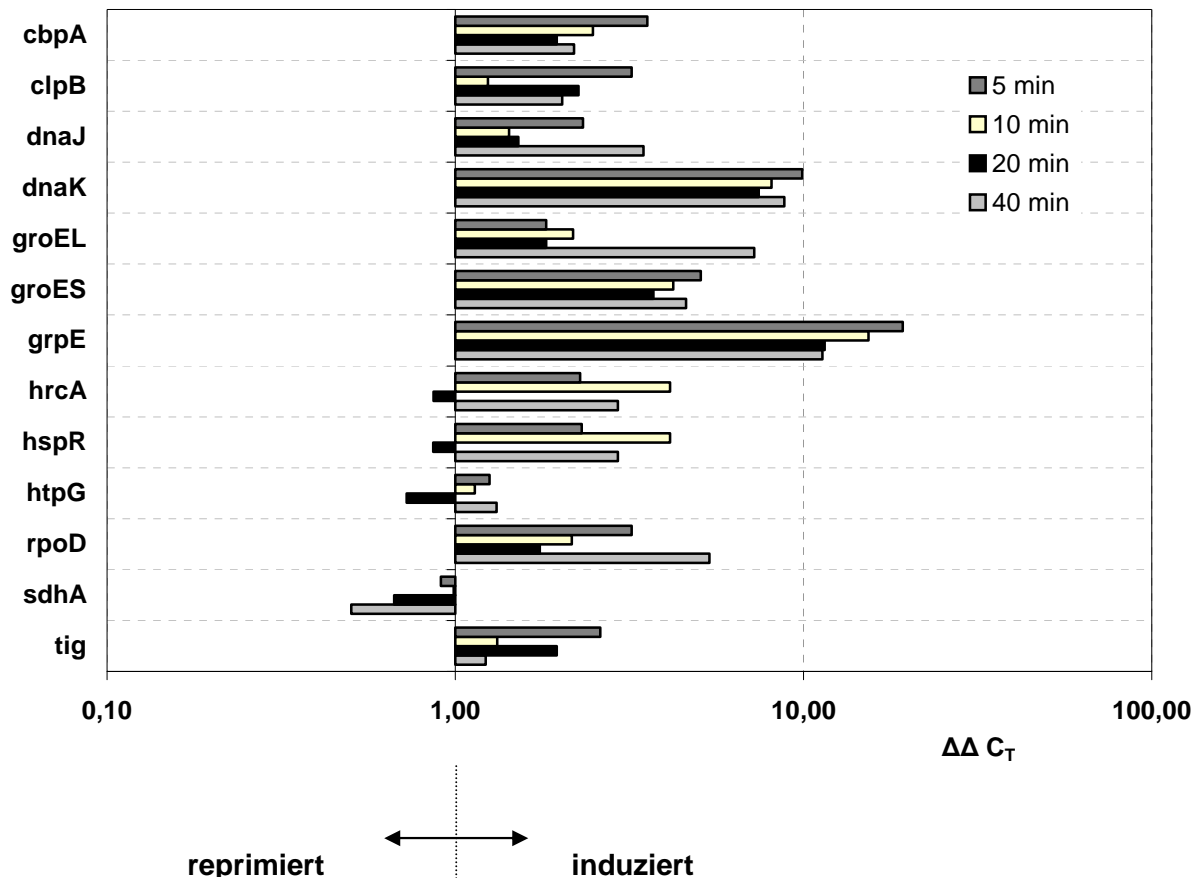


Abbildung 19: relative Quantifizierung 11 ausgewählter Hitzeschockgene, einschließlich eines Sigmafaktors (*rpoD*) und eines Stoffwechselgens (*sdhA*) mittels Real-time PCR nach einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 44 °C [n=4]

Die Expression von *hspR* wird von *C. jejuni* als Reaktion auf einen Hitzestress (42 °C bis 46 °C) relativ konstant induziert. Die höchsten Expressionen von *hspR* wurden bei einer Temperatur von 44 °C (bezogen auf 37 °C) gemessen. Die Inkubationsdauer spielt dabei keine signifikante Rolle. Die Expression von *htpG* zeigt sich temperaturabhängig. Messungen des RNA-Levels zeigen eine starke Induktion bei 42 °C und 5 min. Mit steigender Inkubationsdauer und Temperatur sinken die Transkriptionsmengen auf moderate Werte. Dabei lassen die ermittelten Expressionswerte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Inkubationszeiten erkennen.

C. jejuni reagiert auf einen Hitzestress von 42 °C bis 46 °C durch eine signifikant erhöhte Expression der Chaperone *groEL* und *groES*. Bei 42 °C und 44 °C wird die Expression des Chaperone durch den Organismus ähnlich induziert. Es zeigen sich dabei innerhalb der einzelnen Zeitabstufungen keine signifikanten Unterschiede. Die höchsten Expressionen von *groEL* und *groES* wurden bei einer Temperatur von 46 °C (bezogen auf 37 °C) gemessen.

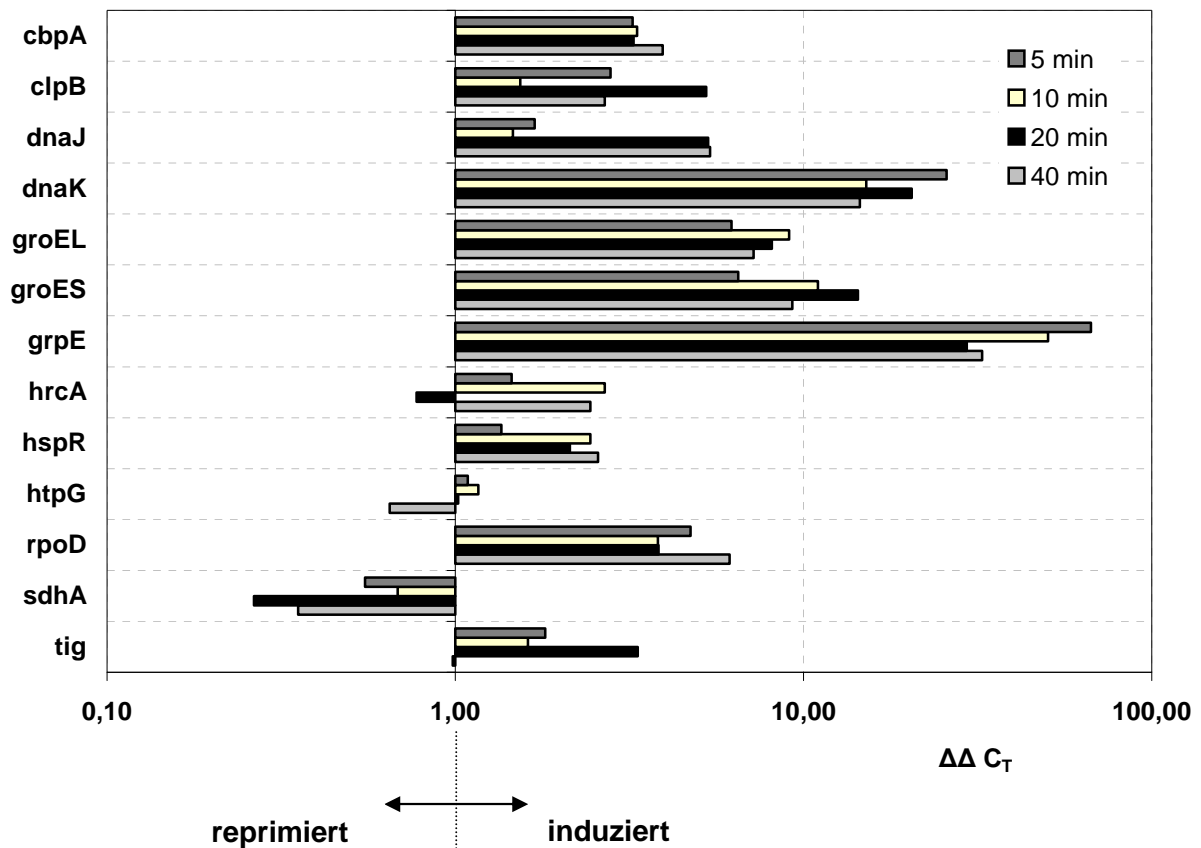


Abbildung 20: relative Quantifizierung 11 ausgewählter Hitzeschockgene, einschließlich eines Sigmafaktors (*rpoD*) und eines Stoffwechselgens (*sdhA*) mittels Real-time PCR nach einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 46 °C [n=4]

Unter Einwirkung eines Hitzestresses von 37 °C auf 42 °C, 44 °C und 46 °C wird *tig* (Trigger-Faktor) mit ähnlichen Transkriptmengen von *C. jejuni* exprimiert. Dabei spielt die Inkubationszeit eine signifikante Rolle ($p=0,042$). Bei 42 °C und 44 °C wird das Gen nach 5 min hochreguliert, während längere Inkubationszeiten in keiner weiteren Erhöhung der Transkriptmengen resultieren. Unter einem Temperaturstress von 46 °C lassen die gemessenen RNA-Level jedoch auch auf eine andauernde Funktion schließen, da diese mit zunehmender Inkubationsdauer bis 20 min ansteigen. Ein gewählter Marker des Energiemetabolismus (*sdhA*) zeigte infolge eines Hitzeschockes über den gesamten Temperaturbereich eine gehemmte Expression.

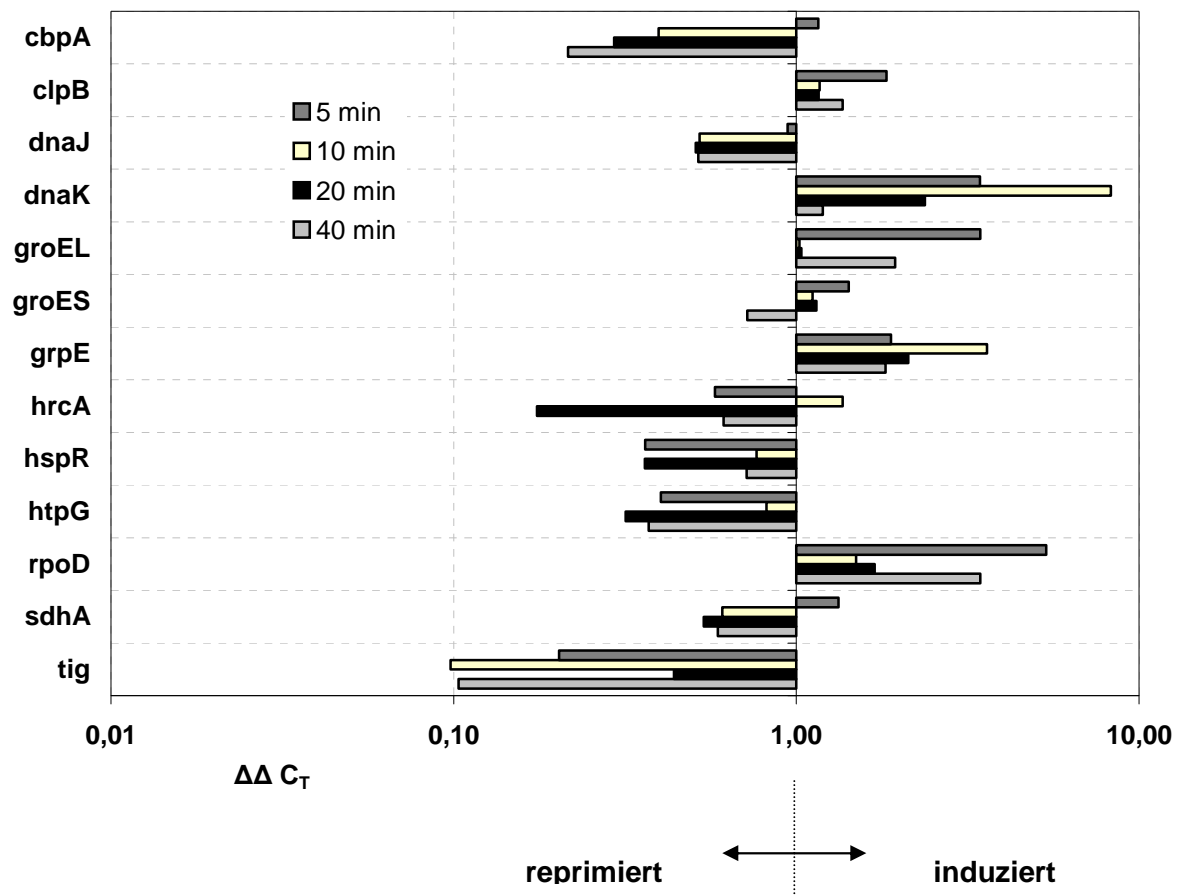


Abbildung 21: relative Quantifizierung ausgewählter Hitzeschockgene, *rpoD* (Sigmafaktor) und *sdhA* (Stoffwechsel) nach einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 50 °C [n=4]

Bei einem Hitzeschock von 50 °C (bezogen auf 37 °C) wird von den untersuchten Genen nur noch die Expression von *clpB*, *dnaK*, *grpE*, *groEL*, *groES* und *rpoD* induziert. Die Transkriptlevel sind jedoch deutlich niedriger als bei 42 °C-46 °C, ausgenommen *rpoD*. Während bei *grpE* unter einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 42 °C bis 46 °C die höchste Transkriprate im Vergleich zu allen anderen untersuchten Genen gemessen wurde, resultiert ein Temperaturschock von 50 °C in einer höheren Transkriptmenge von *dnaK* gegenüber *grpE*. Beide Gene zeigen jedoch ihre höchsten Transkripraten bei 50 °C/10 min. Eine weitere Inkubation bei 50 °C resultiert in gehemmter Transkription von *grpE* und *dnaK*.

Alle anderen Gene werden herunterreguliert.

Zusammenfassende Beschreibung der Expressionsdynamik ohne Berücksichtigung der Inkubationszeit

Die Dauer des Hitzestresses im untersuchten Inkubationszeitraum von 5 min bis 40 min spielte nur bei *grpE*, *dnaK*, *dnaJ* und *tig* eine signifikante Rolle in der Induktion der Expression. Die Expressionsdynamik der einzelnen HSPs lässt sich unter vereinfachter Darstellung in Abbildung 22 direkt miteinander vergleichen. Zum genaueren Verfolgen der Messpunkte wurden marginale Linien eingefügt, welche jedoch Expressionslevel bei einer Temperatur von 48 °C unberücksichtigt lassen und somit den tatsächlichen Verlauf von 46 °C zu 50 °C etwas verzerren. Dennoch lassen sich gut ähnliche Verläufe in der Induktion der Expression beschreiben und Parallelen untereinander erkennen. Insgesamt sind vier verschiedene Reaktionen von *C. jejuni* in der Regulation seiner HSPs auf den Hitzeschock erkennbar.

- I. Die untersuchten Genexpressionen von *grpE*, *dnaK*, *dnaJ*, *clpB* und *tig* zeigen einen nahezu parallelen Verlauf mit unterschiedlichen Intensitäten der Induktion der Expression der Gene. Bei einer Temperatur von 42 °C wird die Genexpression der genannten HSPs hochreguliert, bei 44 °C erfolgt eine leichte Repression der Induktion der Expression. Bei 46 °C jedoch wird die Genexpression wieder um ein Vielfaches stärker induziert. Mit Ausnahme von *tig* werden die hier aufgeführten Gene bei 50 °C weiterhin hochreguliert.
- II. Die Expressionen der Hitzeschockgene *groES* und *cbpA* unterscheidet in ihrer Dynamik eine kontinuierliche Steigerung der Transkriptlevel bis 46 °C. Bei 50 °C wird die Expression des Gens weiterhin, jedoch vermindert induziert.
- III. Die Genexpression des Sigmafaktors *rpoD* und des Chaperons *groEL* werden über 42 °C, 44 °C, 46 °C ohne große Differenzen als induziert beobachtet. Bei 50 °C unterscheiden sich die beiden genannten Gene in ihrer Induktion der Expression: *rpoD* wird auf gleichem Level weiterhin induziert, während das Transkriptlevel von *groEL* sinkt, jedoch immer noch als induziert beschrieben werden muss.
- IV. Die als Negativregulatoren beschriebenen Gene *hrcA* und *hspR* weisen ihr höchstes Transkriptlevel bei 42 °C bzw. bei 44 °C auf. Eine weitere Temperaturerhöhung resultiert in einer zunehmenden Hemmung der Expression der Gene. Bei 50 °C wird die Expression von *hrcA* und *hspR*, wie bereits erwähnt, nicht mehr induziert.

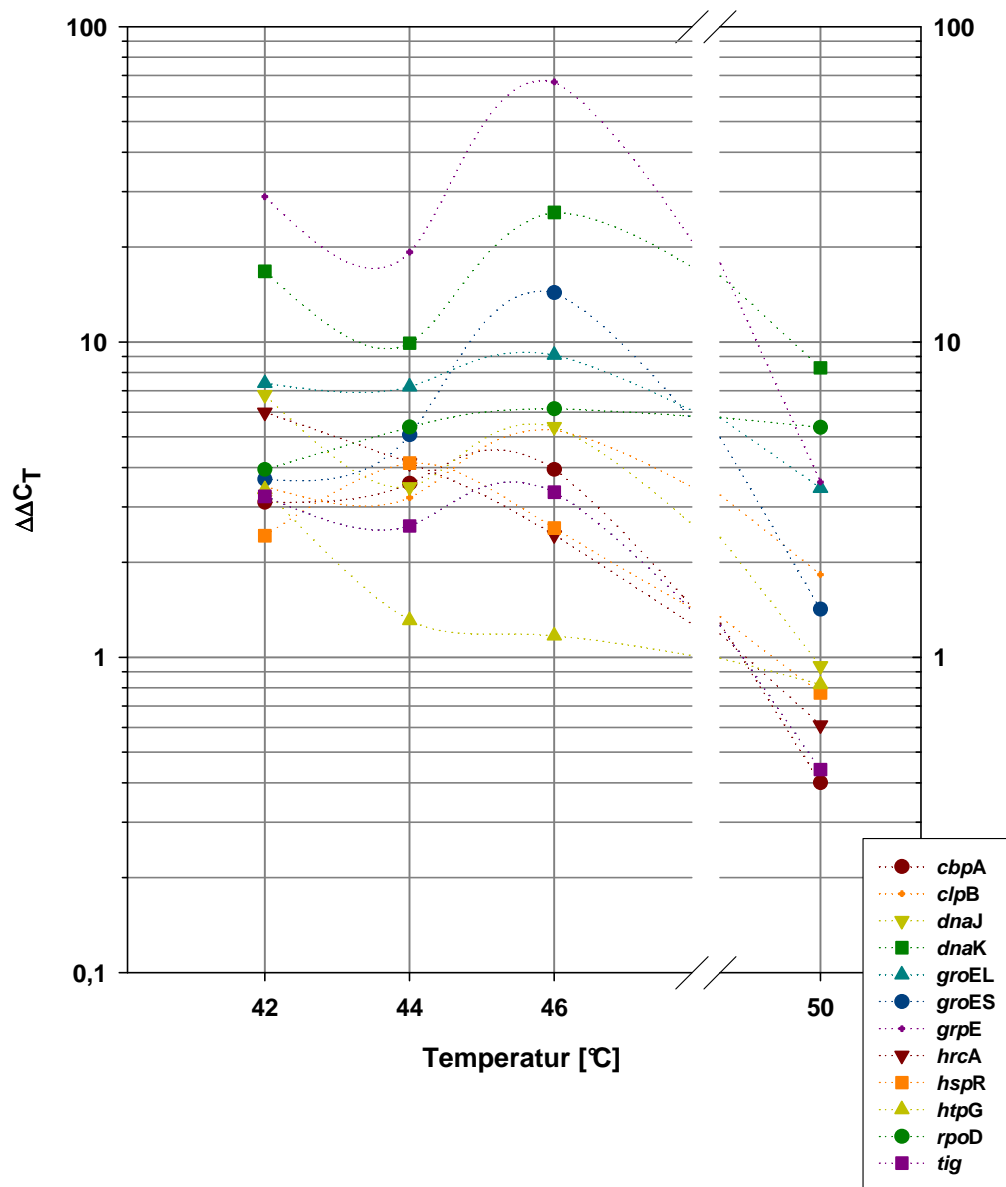


Abbildung 22: Regulation des Genexpressionslevels verschiedener Hitzeschockproteine nach einem Temperaturstress von 42 °C bis 50 °C im Vergleich zu 37 °C ohne Berücksichtigung der Zeit*

* Daten repräsentieren die stärkste Induktion der Expression innerhalb einer Inkubationszeit von 5 min, 10 min, 20 min, 40 min

5 Diskussion

Kaum ein Forschungsgebiet ist so komplex wie die Lebensmittelforschung. Sie erfordert eine optimale Vernetzung von angewandter Forschung und Grundlagenforschung, von Wissenschaft, Wirtschaft und Praxis. Lebensmittelinfektionserreger spielen eine große Rolle im täglichen Umgang mit Lebensmitteln. Dabei sind *Campylobacter* spp. neben *Salmonella* spp. in Deutschland die bedeutendsten bakteriellen Erreger humaner Durchfallerkrankungen (RKI 2008).

Thermophile *Campylobacter* erscheinen im Vergleich zu vielen anderen lebensmittelassoziierten Mikroorganismen empfindlich gegenüber zahlreichen Umwelteinflüssen. Jedoch hat *Campylobacter* alternative Mechanismen entwickelt, um in der Umwelt und der Lebensmittelkette zu überleben. Diese Stressantwortmechanismen sind weitestgehend ungeklärt (PARK, 2002). Bekannt ist jedoch, dass der entscheidende Faktor zur Anpassung des Mikroorganismus an Veränderungen in seiner Umwelt die Konzentration der mRNA, die dem jeweiligen Protein entspricht, die Häufigkeit, mit der diese mRNA translatiert wird und die Stabilität des Proteins selbst sind. Um das Verständnis über bakterielle Mechanismen der Stressantwort und Stressadaptation zu vertiefen, wurden zeitlich abgestufte Genexpressionsstudien durchgeführt. Stress wurde in Form von Temperaturerhöhung (Hitze) auf den Mikroorganismus ausgeübt. Anhand von Analysen mit Hilfe des Kompletengenomchips von *C. jejuni* NCTC 11168 konnte eine Regulation der Stressantwort des Mikroorganismus durch seine veränderte Genexpression aufgezeigt werden. Dabei wurden u.a. Hitzeschockgene unter allen Inkubationszeiten hochreguliert. Die Frage, ob auch die Transkription eines begrenzten Satzes von Genen, die für Proteine kodieren, die das Überleben der Zelle fördern, einem dynamischen, stressabhängigen Regulationsprozess unterliegen, konnte mittels relativer Quantifizierung ausgewählter Gene studiert werden. Denn über die Funktion der meisten Hitzeschockproteine ist tatsächlich wenig bekannt. Mit kulturellen Nachweismethoden (Keimzählungen) wurden bis dato viele Studien zur Hitzetoleranz von *C. jejuni* gemacht (Jasson et al., 2007; MIHALJEVIC et al., 2007; KLANČNIK et al., 2006; NGUYEN et al., 2006; BIRK et al., 2004). Erste molekularbiologische Untersuchungen versuchen partiell die Regulation der Hitzeschockantwort zu erklären.

In eigenen Versuchen wurden Bakterienkulturen von *C. jejuni* auf 46 °C erhitzt. Nach Erreichen der Temperatur erfolgten nach 5 min, 10 min und 20 min phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen der Bakterienzellen. Eine optimale Methode zur Isolierung der Gesamt-RNA von *C. jejuni* musste erst erarbeitet werden. Dazu waren viele

Evaluierungsschritte notwendig, denn aus der Literatur entnommene Protokolle führten zu einer für das Mikroarray-Experiment zu niedrigen RNA-Ausbeute mit zum Teil ungenügender Reinheit.

Der milde Temperaturstress resultierte nach Auswertung der Keimzählungen von verschiedenen *C. jejuni*-Isolaten in einer Minderung der Keimzahl. Mittels Mikroskopie und unter Einsatz eines Lebend-Tod-Färbeverfahrens konnten keine morphologischen Unterschiede zu einer Kontroll-Bakteriensuspension (37°C), welche auf eine subletale Schädigung der Zellen schließen ließen, festgestellt werden. Jedoch konnten mittels Mikroarraytechnologie drei verschiedene Genexpressionsprofile des Genoms beschrieben werden. Die ermittelten Expressionsdaten zeigten sich 5 min bis 20 min nach Temperaturerhöhung teilweise in hohem Grade transient. Vergleichbar mit Ergebnissen von globalen Genexpressionsstudien von STINTZI (2003) und VAN DER VEEN et al. (2007) konnten eine Regulation und eine Anpassung der Transkriptlevel von *C. jejuni* an die erhöhte Temperatur auf Genomebene beobachtet und aufgezeigt werden. STINTZI (2003) beschrieb ein Genexpresionsprofil von *C. jejuni* und setzte Forschungsschwerpunkte in die Analyse der Fähigkeit des Organismus zum einen im Geflügeldarm (42 °C) zu kolonisieren, zum anderen beim Menschen (37 °C) eine Infektion auszulösen. Die dabei gewonnenen Daten erlaubten durch ein Clustering ähnlich exprimierter Gene einen Einblick in mögliche Genfunktionen. Die vorliegende Arbeit hat einen ähnlichen Versuchsaufbau, nur sollen die ermittelten Ergebnisse weniger der Beschreibung des Kolonisationsvermögens bei Geflügel und Menschen dienen, sondern der Diskussion der Hitzestressantwort von *Campylobacter* in der Lebensmittelkette.

Im Focus der Experimente stand die Frage nach dem Genexpressionsverhalten von *C. jejuni* an seiner oberen Wachstumsgrenze, welche mit einer Temperatur von ~46 °C angegeben wird (HUMPHREY et al. 2006; BEUTLING, 1998), um die Adaptation des Mikroorganismus an die Stresssituation zu veranschaulichen bzw. festzustellen an welchem Zeitpunkt der Mikroorganismus besonders empfindlich einem weiteren Stressor gegenüber reagieren könnte. Zusätzlich sollte eine Erkenntnis über eine möglicherweise differente Genexpression von aviären und humanen *C. jejuni*-Isolaten gewonnen werden.

5.1 Die Adaptation an geänderte Temperaturen ist zeitlich reguliert

Die im Mikroarray-Experiment ermittelten differentiell exprimierten Gene wurden einer erstellten Funktionsdatenbank (vereinfacht übernommen vom Sanger Institut, 2007) zugeordnet und ausgewertet. Der Anteil bekannter Gene, welche Hitzeschockproteine und Chaperone kodieren, war groß. Durchschnittlich 50 % dieser Hitzeschockgene wurden über einen Zeitraum von 5 min bis 20 min reguliert. Dabei finden sich nach allen

Inkubationszeitpunkten teilweise sehr hohe Transkriptionsraten der Hitzeschockgene *hrcA*, *grpE*, *groEL*, *groES*, *cbpA* und *dnaJ*.

Dagegen waren in allen anderen Funktionsgruppen (mikromolekularer Stoffwechsel, Gene mit breiten regulatorischen Funktionen, Signaltransduktion, Makromolekularmetabolismus, Zellprozesse) nur durchschnittlich 20-30 % der angelegten Gene auch tatsächlich differentiell exprimiert.

Es ließ sich beobachten, dass nach 10 min und nach 20 min Temperaturstress (46 °C) mehr Gene differentiell exprimiert wurden als unmittelbar nach 5 min Inkubation. Diese Beobachtung ist identisch mit der von STINTZI (2003). Eine zeitliche Adaptation an den Hitzestress konnte anhand der Graphiken veranschaulicht werden (Abb. 15, S. 55). Das Genexpressionsmuster, welches jeweils nach den drei Inkubationszeitpunkten aufgezeigt werden konnte, beschreibt drei Phasen des Verhaltens von *Campylobacter* nach Einwirkung von Hitzestress. BONNER et al. (2000) beobachteten in einer Studie mit *Saccharomyces cerevisiae* eine in drei Stufen teilbare Regulation des „heat shock transcription factor“ (HSF). Übertragen auf eigene Ergebnisse kann ein Temperaturstress von 46 °C nach 5 min als (1) „akute Phase“ beschrieben werden. Gene des Energiemetabolismus werden verstärkt unmittelbar nach der Temperaturerhöhung induziert. Die Adaptation und die Regulation einer Hitzeschockantwort ist für die Zelle von *C. jejuni* gleichermaßen energieaufwendig wie bei einem Kälteschock (MOEN et al., 2005; MENSORIDES et al., 2002). In allen Bereichen des Stoffwechsels von *C. jejuni* werden vermehrt Gene induziert. Auffällig viele Gene, welche für den Makromolekülmetabolismus (RNA-DNA-Metabolismus) kodieren, werden zusätzlich induziert. Diese Beobachtung teilen MENSORIDES et al. (2002), wonach der RNA-Gehalt einer Zelle nach einer Temperaturerhöhung ansteigt. Intrazelluläre Prozesse, wie die Transkription und die Translation, aber auch extrazelluläre Proteine werden zunehmend mit protektiven Mechanismen bei Hitze- und Säurestress in Verbindung gebracht (VANBOGELEN et al., 1990).

In einer sogenannten (2) „Adaptationsphase“ nach 10 min wird eine deutliche Senkung der Transkriptmengen beobachtet. Während im mikromolekularen Stoffwechsel weniger Gene reguliert werden, lassen die Auswertungen der Anzahl regulierter Gene, welche für Zellentwicklung, Zellprozesse und unbekannte Prozesse kodieren, eine Steigerung erkennen. Dabei überwiegt die Anzahl der reprimierten Gene gegenüber den induzierten Genen jedoch deutlich. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei den identifizierten Genen (Induktionslevel >1,5) mindestens teilweise um essentielle Gene zur Aufrechterhaltung der Überlebensfähigkeit handelt. Bei einer Analyse des Genoms von *B. subtilis* wurden von 4100 Genen lediglich 271 Gene als essentiell zur Aufrechterhaltung minimaler Lebensfunktionen der Zelle identifiziert; 52 davon waren Gene, welche ribosomale Proteine kodieren und essentiell für die Proteinsynthese sind (KOBAYASHI et al., 2003). Die Annahme von

NGUYEN et al. (2006), dass diese essentiellen Gene auch für *E. coli* entscheidend für seine Überlebensfähigkeit sind, bestätigte sich nach einem Vergleich mit den Ergebnissen von MOGK et al. (1999) nicht, lediglich 8 Gene mit ähnlichen Funktionen wurden beschrieben.

Nach einem Temperaturstress von 20 min hat sich in eigenen Experimenten ein (3) „*steady-state* Level“ eingestellt, welches anhand des ausgeglichenen Verhältnisses zwischen induzierten und reprimierten Transkripten verdeutlicht wird. Es werden im gesamten Stoffwechsel wieder überwiegend mehr Gene induziert. Der Organismus scheint sich auf die neue Temperatur eingestellt zu haben. Ein guter Indikator dafür ist die angestiegene Induktion der Gene, welche für Funktionen im mikromolekularen Metabolismus kodieren. Hitzeschockproteine werden weiterhin stark induziert, des Weiteren werden mehr Gene, welche für die Funktionen in der Synthese und Modifikation von Makromolekülen, Degradierung von Makromolekülen, Zellentwicklung und Andere kodieren, als induktiv reguliert beobachtet.

Durch relative Quantifizierung von Transkripten ausgewählten Hitzeschockgene mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurden die Mikroarray-Ergebnisse verifiziert. Eine fünffach höhere Expressionsrate der Gene nach Mikroarray-Analysen im Gegensatz zu den Expressionsraten dieser Gene nach relativer Quantifizierung mit Hilfe der quantitativen RT-PCR, wie von STINTZI (2003) exemplarisch demonstriert, konnte in eigenen Untersuchungen nicht für alle untersuchten Gene bestätigt werden. Auch wenn Genexpressionsstudien, wie die von STINTZI (2003) und VAN DER VEEN et al. (2007), eine durchschnittlich fünffach höhere Expression der Gene von Array-Daten erfasst haben, so beschreiben andere Studien eine Divergenz zwischen beiden Methoden mit einem Faktor von 1,3-31 (WURMBACH et al., 2001). Dies zeigt, dass Mikroarrayergebnisse als semiquantitativ zu beurteilen sind. QUACKENBUSH (2006) und KUO et al. (2006) stellen die absolute Vergleichbarkeit von Mikroarray-Daten mit den Ergebnissen von relativer Quantifizierung durch quantitative RT-PCR in Frage und empfehlen, solche Mikroarraydaten nur als Trends zu interpretieren.

5.2 Analyse ausgewählter Hitzeschockgene von *C. jejuni* NCTC 11168

Ein Vergleich der Hitzeschockreaktionen von *C. jejuni*, *E. coli* und *B. subtilis* bei 42 °C lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich *Campylobacter* mehr als einer Strategie zur Regulation seiner Hitzeschockantwort bedient (STINTZI, 2003).

An diese Erkenntnisse wird mit der vorliegenden Arbeit angeknüpft. Es wird die Kinetik 11 ausgewählter Hitzeschockgene (*cbpA*, *clpB*, *dnaJ*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *grpE*, *hrcA*, *hspR*, *htpG*, *tig*), eines RNA-Polymerase-Sigmafaktors (*rpoD*) und eines Stoffwechselmarkers (*sdhA*) bis zu einer Temperatur von 50 °C aufgezeigt. Da bei wird nicht nur die Reaktion des

Mikroorganismus vor und nach dem Hitzeschock betrachtet, sondern verschiedene Zeit- und Temperaturabstufungen ermöglichen eine detaillierte Beschreibung der Hitzeschockantwort von *C. jejuni* mittels der Regulation ausgewählter Hitzeschockgene. Dabei erlauben die gewonnenen Daten sowohl eine Aussage über den Einfluss der Temperatur als auch der Zeit auf das Expressionslevel der untersuchten Gene.

Bei einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 42 °C wird die Expression aller untersuchten Hitzeschockgene sowie *rpoD* induziert. Die Succinat-Dehydrogenase (*sdhA*), involviert in den Tricarbonsäurezyklus, zeigte unter der relativen Quantifizierung bereits eine gehemmte Transkription. Die metabolische Relevanz für ein Herunterregulieren von *sdhA* bei 42°C ist bisher unklar (DORRELL et al., 2001). Eine sprunghaft angestiegene Induktion der Expression, nicht nur von Hitzeschockgenen, sondern auch anderer in weiteren Experimenten ermittelter Gene, führt zu der Annahme, dass 42 °C bereits einen milden Temperaturschock für *Campylobacter* darzustellen scheinen (STINTZI, 2003).

Keimzählungen von *C. jejuni* bei 37 °C und 42 °C zeigen eine höhere Wachstumsrate des Mikroorganismus bei 37 °C (KHANNA et al., 2006). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Studien, welche eine optimale Wachstumstemperatur von *C. jejuni* von 42 °C angaben (SNELLING et al., 2005; NEWELL, 2001; VAN VLIET und KETLEY, 2001). Dabei versuchen Studien Zusammenhänge zwischen Temperatur und Regulation der Virulenz von *C. jejuni* aufzuzeigen, so wird eine Temperatur von 37 °C mit potenzieller Virulenz des Mikroorganismus in Verbindung gebracht und die Avirulenz bei Geflügel (42°C) erklärt (KHANNA et al., 2006; CHAKRABARTI et al., 1999). Die Einbeziehung von Wachstumstemperatur des Mikroorganismus *C. jejuni* und des Lebensmittelmediums spielen des Weiteren eine wichtige Rolle in der Bewertung der Überlebensfähigkeit des Lebensmittelinfektionserregers. Eine Studie von DUFFY und DYKES (2006) indiziert eine größere Überlebensfähigkeit tierischer *C. jejuni*-Isolate unter einer Wachstumstemperatur von 37 °C im Wasser und in Geflügelfleisch, als die im Vergleich bei 42 °C angezüchteten Stämme. In Rindfleisch inokulierte *C. jejuni*-Isolate zeigten eine gegensätzliche Überlebensrate. Diese Erkenntnisse sind als ein wichtiger Aspekt in der Vergleichbarkeit von *C. jejuni* Adaptations- und Überlebensstudien (KÄRENLAMPI und HÄNNINEN, 2004; BIRK et al., 2004; THOMAS et al., 1999; LEE et al., 1998) zu berücksichtigen.

Ein weiterer Faktor, welcher bei der Stresstoleranz von *Campylobacter* spp. eine wichtige Rolle spielt, ist die Wachstumsphase (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2004; KELLY et al., 2001). Experimentelle Studien zur Überlebensfähigkeit arbeiten sowohl mit Bakterienzellen der exponentiellen Phase als auch der stationären Phase. Dadurch wird die Vergleichbarkeit von Ergebnissen gemindert. Im Gegensatz zu anderen Bakterienspezies zeigt *C. jejuni* in der exponentiellen Phase eine vergleichsweise höhere Stressresistenz (KELLY et al., 2001). Um markante Hitzeschockreaktionen aufzeigen zu können, wurde deshalb mit *C. jejuni*-Zellen

der exponentiellen Phase gearbeitet. Ein Vergleich der Transkriptionslevel von *groEL* und *rpoD* unter einem Hitzestress von 55 °C zeigte eine stärkere Induktion der Expression in der exponentiellen Phase gestresster Zellen als in der stationären Phase, diese war jedoch zeitlich verzögert (KLANČNIK et al., 2006).

Die Regulation der Transkription von Hitzeschockgenen als Stressantwort auf einen Hitzestress von 44 °C zeigt bereits Unterschiede in der Expressionsdynamik der untersuchten Gene. Dabei zeigen sich, wie vermutet, gleiche Expressionsmuster unter den Genen, welche zusammen als Chaperonsysteme (*grpE*, *dnaK*, *dnaJ*) oder als Bi-Chaperonsystemen funktionieren (*clpB*, *dnaK*). Weiterhin zeigten die als Negativregulatoren bekannten Gene *hrcA* und *hspR* und der Triggerfaktor *tig*, welcher bereits am Ribosom neu synthetisierte Proteine bindet (MOGK et al., 2001) gleiche Genexpressionsmuster bei der gesamtheitlichen Betrachtung. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von STINTZI (2003) wurde das Hitzeschockgen *grpE* in allen untersuchten Temperaturbereichen mit der höchsten Expressionsrate ermittelt. Die genaue Funktion des Proteins, für welches das Transkript von *grpE* kodiert, ist bislang noch nicht charakterisiert. Bekannt ist, dass *grpE* zusammen mit *dnaK* und *hrcA* in einem Operon lokalisiert ist und als möglicher Thermosensor fungiert (PARK, 2002; THIES et al., 1999a). Das Chaperon *dnaK* wird ähnlich wie *grpE* bei Hitzestress stark exprimiert. Dabei stehen die Transkripte von *dnaK* und *grpE* in einem bestimmten Verhältnis zueinander, welches sich bei einer Temperaturerhöhung von 46 °C umkehrt. Die physiologische Konsequenz für eine genaue Ratio von *dnaK* und *grpE* liegt in der Kontrolle der Proteinqualität durch das *dnaK-dnaJ-grpE* Chaperonsystem und für die Zellteilung in *E. coli* (SUGIMOTO et al., 2008).

Bei der Untersuchung der Expressionsdynamik im gesamten Temperaturbereich ohne Berücksichtigung der Inkubationszeit konnten die ausgewählten Gene vier verschiedenen Expressionsmustern zugeordnet werden, wobei die Transkriptionsrate des jeweiligen Genes bei 44 °C eine entscheidende Bedeutung spielte. Die Mehrheit der untersuchten Gene ließ im Vergleich zu 42 °C eine verminderte Induktion der Expression beobachten. Ausnahmen waren der Sigmafaktor *rpoD*, das Chaperon *groEL* und *hspR*. Das als Negativregulator beschriebene *hspR* zeigt bei einem Temperaturstress von 44 °C die höchste Induktion seiner Genexpression. Seine wichtige regulatorische Funktion beschränkt sich dabei nicht nur auf den Temperaturstress: Die Inaktivierung von *hspR* resultierte in einer gestörten Kolonisationsfähigkeit von *C. jejuni* bei 44 °C, des Weiteren wurden insgesamt 30 Gene identifiziert, welche eine veränderte Genexpression durch das Fehlen von *hspR* zeigten (ANDERSEN et al., 2005). Dies deutet auf regulatorische Funktionen hin, welche die Autoren unter anderem in der Kontrolle der Expression von Genen, die in diverse Prozesse, wie die Motilität, die Stresstoleranz, die Morphologie und Virulenz involviert sind, beschreiben. Die Transkriptionslevel von *rpoD* und *groEL* zeigten eine weitere Steigerung im Vergleich zu

42 °C und damit auch eine stressabhängige Induktion der Transkription. Die Expressionsdynamik beider Gene zeigen einen ähnlichen Verlauf. Eine weitere Studie bestätigt eine Induktion der Expression von *rpoD* und *groEL* bei einem Temperaturstress von 55 °C und lässt somit eine weiterführende Betrachtung des Verlaufes der Expressionsdynamik zu (KLANČNIK et al., 2006). Interessant wäre die weitere Beobachtung der Transkriptlevel von *groES*. Denn *groES* fungiert als Co-Chaperon von *groEL* in der *De-novo*-Proteinfaltung (MOGK et al., 2001).

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 46 °C resultierte in einer deutlichen Steigerung der Expressionslevel aller untersuchten Gene, mit Ausnahme von *htpG*, *hrcA* und *hspR*. Bis auf diese Gene wird bei allen anderen untersuchten HSPs die höchste Transkriprate infolge des Temperaturstress bestimmt. Der Temperaturbereich für ein kulturelles Wachstum thermophiler *Campylobacter* erstreckt sich von einer untersten Wachstumsgrenze von 30 °C bis zu einer maximalen Temperatur von ca. 46 °C (HUMHREY et al., 2007; ALTER und SCHERER, 2006; HAZELEGER et al., 1998). Vorliegende Ergebnisse zeigen, dass auf Genexpressionsebene, besonders durch die maximale Steigerung der Transkriptionslevel fast aller Hitzeschockgene, eine Temperatur von 46 °C als ein deutlicher Schwellenwert erkennbar ist.

Eine Temperatur von 50 °C sollte als weitere Grenze, die eines subletalen Temperaturstress, angesehen werden. Bis zu einer Temperatur von 46 °C erfolgt eine Regulation des Temperaturstress, ohne subletale Schädigung der Zellen. Messungen der Induktion der Expression von Hitzeschockgenen bei 48 °C wurden daher nicht durchgeführt. Jedoch Ergebnisse weiterer Studien zeigen starke Induktionen der Expression einzelner Hitzeschockgene (*clpB*, *dnaK*, *groEL*, *groES*) bei einem Temperaturschock von 48 °C mittels Northern-Blot-Analyse (THIES et al., 1999a; THIES et al., 1999b; THIES et al., 1999c). Die Ergebnisse benannter Studien und die mikroskopische Untersuchung unter Einsatz eines Lebend-Tod-Färbeverfahrens (vgl. S. 51) führen zu der Annahme, dass *C. jejuni* Temperaturen von 46 °C und 48 °C unter Ausbildung ähnlicher Expressionsmuster der untersuchten Hitzeschockgene toleriert.

Unter einem Temperaturstress von 50 °C wird deutlich, dass der Mikroorganismus in diesem Temperaturbereich sein Vermögen, Hitzeschockproteine zu regulieren, umstellt. Auch wenn bereits subletale Schädigungen der Zellen beobachtet werden, so ist als Antwort auf den Hitzestress noch eine Induktion der Hitzeschockgene *clpB*, *grpE*, *dnaK*, *groEL* und *groES* messbar. Die für die Zelle unter Hitzestress so wichtigen Funktionen wie die Wiederherstellung hitzeinduzierter Zellschäden, die Regulation der Proteolyse, die Unterdrückung der Aggregation denaturierter Proteine, die Modifikation der Faltung von Proteinen sowie die Funktion des Thermosensors (Sanger Institut, 2007; PARK, 2002; THIES et al., 1999a; THIES et al., 1999b), werden auch bei 50°C weiter durch die Induktion

der Expression entsprechender Hitzeschockgene aufrechterhalten. Gleichmaßen zeigte die Expression der Haushaltsgene (16S rRNA und *thiC*) weiterhin Stabilität. Für alle anderen untersuchten Hitzeschockgene (*cbpA*, *dnaJ*, *hrcA*, *hspR*, *htpG*, *tig*) war bei 50 °C keine Induktion von Transkripten mehr messbar. Da die Genexpression von *hrcA* und *hspR* bei 50 °C herunterreguliert wird, kommen vermutlich neben dem alternativen Sigmafaktor *rpoD* andere Regulationsmechanismen zum Einsatz.

Mehrere regulatorische Systeme kontrollieren die Regulation der Hitzeschockantwort bei *C. jejuni*: das *racRS* Regulon, als Zwei-Komponenten-Regulationssystem und *hrcA* und *hspR* als vermutliche Negativregulatoren der Hitzeschockantwort (PARK, 2002; BRAS et al., 1999b).

Bisher sind lediglich drei Sigmafaktoren (σ^{70} , σ^{54} , σ^{28}) von *C. jejuni* beschrieben (JAGANNATHAN et al., 2001). Jedoch besteht die Vermutung, dass diese breitere regulatorische Funktionen erfüllen als in anderen Bakterienspezies beobachtet (PETERSEN et al., 2003). Sigmafaktor σ^{70} wird durch das *housekeeping*-Sigmafaktor-Gen *rpoD* codiert (WOSTEN et al., 1998). Ein Hinweis auf eine übergreifende Funktion ist die stabile Induktion der Expression von *rpoD* während eines Temperaturstresses von 42 °C bis 50 °C. Das beobachtete Genexpressionsmuster von *rpoD* spiegelt den dynamischen Prozess des *housekeeping* Metabolismus wieder, welcher den Mikroorganismus *C. jejuni* zur Adaptation an veränderte Umweltbedingungen befähigt (VANDECASTEELE et al., 2001). Als RNA-Polymerase-Sigma Faktor ist *rpoD* in die Proteinsynthese involviert und essentiell für das Überleben der Zelle. Untersuchungen der Hitzeresistenz von *Campylobacter* zeigten, dass ein Absterben der Zelle unmittelbar mit der Denaturierung der Ribosomen zusammenhängt (NGUYEN et al., 2006).

5.3 Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz

Verzehrsfertige Lebensmittel, in denen thermotolerante *Campylobacter* nachgewiesen wurden, werden gemäß §5 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) in Verbindung mit Artikel 14 EU VO 178/2002 als gesundheitsschädlich beanstandet.

Die Belastung roher tierischer Lebensmittel mit thermotoleranten *Campylobacter* wird routinemäßig im Zuge von Monitoringaktionen überprüft. *Campylobacter*-freie rohe tierische Lebensmittel sind derzeit nicht zu gewährleisten, daher muss die Prävention bzw. Bekämpfung lebensmittelassoziierter Infektionen durch *Campylobacter* bereits in der Primärproduktion beginnen. Zudem müssen die Schlacht- und Verarbeitungstechniken einzeln und in Kombination betrachtet werden, um Kontaminationen und Ausbreitung des Keimes einzuschränken. Derzeit müssen Verbraucher davon ausgehen, dass insbesondere rohes Geflügelfleisch in hohem Grade mit *Campylobacter* belastet ist. Der Konsument selbst

muss Hürden schaffen, um *Campylobacter* spp. sicher abzutöten. Jedoch bei der Wahrnehmung von Gesundheitsrisiken durch Lebensmittel unterscheiden sich die Einschätzungen von Experten und der Öffentlichkeit. Risikoeinschätzungen von Verbrauchern sind in einem hohen Maß von der aktuell in Medien geführten öffentlichen Diskussion abhängig. Allgemeine Verbraucherinformationen zur Küchenhygiene im privaten Haushalt erfahren vergleichsweise geringere Beachtung (ARBEITSGRUPPE LEBENSMITTELQUALITÄT UND -SICHERHEIT, 2002). Die für lebensmittelverarbeitende Betriebe durch die VO (EG) 852/2004 Anhang II, Kap. XII vorgeschriebenen Hygiene-Schulungen könnten langfristig die Inzidenz für campylobacterbedingte Enteritis-Infektionen senken. Dabei ist besonders ein Problembewusstsein bei Verantwortlichen in der Gemeinschaftsverpflegung und in vorgelagerten Verarbeitungsbetrieben notwendig. Die Vorlage eines Gesundheitszeugnisses bei Neueinstellung aller Berufe mit gewerblichem Umgang mit Lebensmitteln, sowie Belehrungen durch den Arbeitgeber sind durch das IFSG § 43 vorgeschrieben. Eine Kontamination von Lebensmitteln mit *Campylobacter* spp. stellt ein ernstzunehmendes Gesundheitsrisiko dar, wenngleich diese mikrobiell bedingte Enteritis-Erkrankung in der Mehrzahl der Bevölkerung komplikationslos verlaufen und die Symptome nach wenigen Tagen abklingen. Dies gilt jedoch nicht für Risikogruppen wie alte, kranke und immungeschwächte Patienten, sowie Kinder und Schwangere, welche einen nicht unerheblichen Teil der Bevölkerung ausmachen. Des Weiteren sind lebensbedrohliche Folgeerkrankungen, wie das Guillain Barré-Syndrom nicht auszuschließen.

Im Rahmen einer Risikobewertung zur Senkung der Verbraucherexposition wird das Ausmaß an Kreuzkontaminationen im Schlachtprozess von ROSENQUIST et al. (2003) und EVERS (2004) unterschiedlich bewertet. Der Schlachtprozess, mit den verschiedenen Möglichkeiten der Kreuzkontamination, bleibt durch starke Automatisierung und hohe Schlachtzahlen ein kritischer Punkt in der Lebensmittelkette. Den Prozessschritten des Brühens und Entfederns, sowie der Ausweidung wird für die Kontamination und Kreuzkontamination der Tierkörperoberflächen mit *Campylobacter* eine große Bedeutung beigemessen (ALTER et al., 2002). Immerhin werden Temperaturen bis zu 56-57 °C von thermophilen *Campylobacter* toleriert (NGUYEN et al., 2006). Im Schlachtvorgang kann Temperatur in Form von Hitze (Brühbad mit Temperaturen von 50 °C bis 60 °C) keine sichere Abtötung der Keime bewirken, sondern stellt ein Kontaminationsrisiko für vorher unbelastete Schlachtkörper dar (YANG et al., 2001). Des Weiteren können *Campylobacter*, welche thermalen Stress überlebt haben, sich adaptieren und somit widerstandsfähiger gegenüber weiteren Stresssituationen werden (MURPHY et al., 2003b).

Die in dieser Studie verwendeten aviären Stämme stammten von Isolat, welche nach dem Brühbad auf Schlachtkörpern und auf dem Kühlhausboden des Schlachthofes nachgewiesen wurden (vgl. Tabelle 3, S. 29) - Isolate, welche schlachthofspezifische technologische

Stressoren überlebt haben. Erwartete Differenzen in der Stressantwort von aviären und humanen *Campylobacter*-Isolaten konnten unter einem Hitzeschock von 46 °C nicht beobachtet werden. Studien von PARK (2005) und WASSENAAR et al. (1998) geben Aufschluss über die Stammesdiversitäten von *C. jejuni*. Dabei fanden sich Unterschiede im genetischen Material einiger *C. jejuni*-Stämme, welche das Potential für stammesspezifische Mechanismen der Stresstoleranz erhöhen. Dabei ist es wahrscheinlich, dass spezifische Stressbewältigungsstrategien einzelner Stämme erst unter extremen Stressbedingungen zum Einsatz kommen. Interessanterweise sind es meist aviäre *Campylobacter*-Isolate, welche bei *in vitro*- und *in vivo*- Studien eine höhere Überlebensfähigkeit zeigen (MIHALJEVIC et al., 2007; ALTER et al., 2006; BIRK et al., 2004; BUSHWELL et al., 1998). Drei weitere *C. jejuni*-Stämme sollten in die Untersuchung mit einbezogen werden. Unterschiede zwischen den *C. jejuni*-Stämmen zeigten sich teilweise in den Generationszeiten und in der Ausbildungen von Kolonien. Mit der cDNA dieser Isolate gelang keine auswertbare Hybridisierung auf dem Mikroarray-Chip. Möglicherweise spiegelt sich dabei eine Heterogenität der Genome durch eine fehlende Hybridisierung mit den gespotteten Sequenzen auf dem Mikroarray wieder.

Es wird vermutet, dass einzelne Stämme, welche eine oder mehrere Stufen der Lebensmittelproduktion bzw. Stressoren überlebt haben, danach eine höhere Stressresistenz aufweisen und sich somit an diesen Stressor adaptiert haben (MURPHY et al., 2003b). Möglicherweise kann *C. jejuni* durch den Eintritt in den VBNC-Status infolge von Stress die Infektiosität im Lebensmittel aufrechterhalten (JANG et al., 2007; THOLOZAN et al., 1999).

Das Verhalten des Lebensmittelinfektionserregers *C. jejuni* ist in Lebensmitteln bisher noch nicht hinreichend untersucht worden. Es besteht eine Diskrepanz zwischen der mangelhaften Ausstattung von *Campylobacter* mit Stressantwortfaktoren und der Fähigkeit dieses Mikroorganismus, in der Lebensmittelkette zu persistieren. Das Entschlüsseln von Überlebensstrategien von Mikroorganismen in der Lebensmittelkette auf molekularer Ebene wird in Zukunft vermutlich Auswirkungen auf die Lebensmittelsicherheit haben, z.B. in Form von innovativen Verpackungen. Für die Entwicklung von Konzepten um rohe tierische Lebensmittel *Campylobacter*-frei zu produzieren werden Daten benötigt, die die Überlebensmechanismen beschreiben, die Adaptationsprozesse an Stressoren charakterisieren und Möglichkeiten aufzeigen, solche Adaptationen an einzelne Stressoren zu unterbinden. Erste Studien belegen bereits eine Stresstoleranz von *Campylobacter*, die Fähigkeit zur Adaptation und die Bedeutung der Stammdiversitäten.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Fähigkeit von *C. jejuni*, sich unter einem milden Hitzestress anzupassen und deuten auf eine Veränderung in der Regulation der

Genexpression zur Aufrechterhalten des bakteriellen Metabolismus bis 50 °C hin. *In vivo* Untersuchungen müssen jedoch ergänzend folgen, da der Einfluss der Lebensmittelmatrix auf das Überleben der Bakterien unter Stresssituationen von entscheidender Bedeutung ist. Das Phänomen der Hitzeschockantwort und der dadurch induzierten Thermotoleranz, ist von großer, praktischer Bedeutung für die Lebensmittelverarbeitung. Die Intensität dieser Thermotoleranz ist abhängig vom physiologischen Status der Zelle, sowie von der Kombination von Temperatur und Zeit (YOUSEF und COURTNEY, 2003). LINDQUIST et al. (1986) benennen einen Temperaturbereich von 45-50 °C als optimal zur Entwicklung einer Hitzeschockantwort mit zunehmender Thermotoleranz. So zeigten *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* und *L. monocytogenes* außerdem eine veränderte Hitzeresistenz unter einer modifizierten Atmosphäre (ALDSWORTH et al., 1999). Weiterhin zeigte sich eine größere Stabilität und Hitzeresistenz der Zellen von *S. typhimurium* und *L. monocytogenes*, welche sich in Gegenwart von hoher Salzkonzentration oder Magnesiumionen befanden (NGUYEN et al., 2006; TOLKER-NIELSEN et al., 1996; ANDERSON et al., 1991).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Hitzeschockantwort von *C. jejuni* nach einem milden Hitzestress zum einen in einem globalen Expressionsmuster dargestellt werden, zum anderen wurde die Expression von Hitzeschockgenen mit zentraler Bedeutung zum Schutz der Zelle, nicht nur bei thermalem Stress, quantifiziert. Über eine möglich hervorgegangene Adaptation der Zellen konnte in dieser Arbeit nur teilweise eine Aussage gemacht werden. Die Induktion einer Hitzestressantwort ist von der jeweiligen Temperatur und der Dauer der Einwirkung dieses Stressors abhängig. So zeigte sich lediglich für die Expression von *dnaJ*, *tig* und *hrcA* eine signifikante Interaktion von Temperatur und Zeit ($p > 0,05$). Des Weiteren wurde ein tendenziell signifikanter Einfluss der Zeit auf die induzierten Transkriptmengen von *grpE* und *clpB* nach einer Temperaturerhöhung ermittelt. Alle weiteren untersuchten Gene (*cbpA*, *hspR*, *hspG*, *dnaK*, *groEL*, *groES*) zeigten eine Expression unabhängig von der Dauer des Temperaturstresses bis zu einer Temperatur von 46 °C. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des Expressionslevels deuten auf eine Umstellung der Regulationsmechanismen von *Campylobacter* bei 50 °C durch eine veränderte Regulierung von Hitzeschockgenen hin.

Diese Studie zur Beschreibung von mikrobiellen Stressreaktionen von *C. jejuni* ermöglicht die Weiterentwicklung und Sensibilisierung von mikrobiologischen Risikobewertungen. Mikroarray-Analysen könnten in Zukunft die Ergebnisvorhersage einer Konservierungsbehandlung und - bei Notwendigkeit - die Bestimmung von zusätzlichen Konservierungsschritten durch ein Aufzeigen des physiologischen Status, die Identifizierung von Gen- und damit verbunden Virulenzfaktoren von Mikroorganismen ermöglichen. Damit würde die Prozesskontrolle unter Erhalt der sensorischen Eigenschaften bedeutend

verbessert werden. Es muss jedoch zwingend die Hürdentechnik auf das Adaptationsvermögen von *C. jejuni* angepasst werden.

6 Zusammenfassung

Für die Erstellung mikrobiologischer Risikobewertungen, auf deren Grundlage Handlungsstrategien zur Bekämpfung von *Campylobacter* erarbeitet werden können, sind sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen, unter Beobachtung aller Stadien der Produktionsketten, zum Vorkommen von *Campylobacter* sowie molekularbiologische Grundlagenforschung zum besseren Verständnis des Überlebens von *Campylobacter* notwendig.

Die Fähigkeit, schnell auf Änderungen von Umweltbedingungen reagieren zu können, entscheidet über den Überlebenserfolg einzelner Bakterienspezies bzw. einzelner Stämme. Durch Kenntnisse der Überlebensmechanismen unter Einwirkung lebensmitteltechnologischer Prozesse ist es möglich, die Verfahrenstechnik zur Stabilisierung von Lebensmitteln zu optimieren. Doch aufgrund des breiten Wirtsspektrums von *Campylobacter* spp. ist eine Reduktion im Primärproduktionsbereich (Mastphase von Geflügel) schwierig. Erschwerend kommt die geringe minimale Infektionsdosis ($<10^3$ KBE/g) von *Campylobacter* spp. hinzu. Da die intestinale Kolonisation des Geflügels mit *C. jejuni* jedoch selbst durch ein gutes Hygiene-Management nicht vollkommen verhindert werden kann, müssen zusätzliche Hürden geschaffen werden, welche den Eintrag in die Lebensmittelkette inhibieren. Diese Hürdentechnik verlangt eine Anpassung an neueste Erkenntnisse über das Adaptationsverhalten des Mikroorganismus. Die Untersuchung von Überlebensstrategien und Mechanismen der Regulation zur Steigerung der Überlebensfähigkeit, insbesondere durch milde Stressoren, ist von entscheidender Bedeutung und ein wichtiger Forschungsansatz für die Lebensmittelsicherheit. Die Verfügbarkeit genetischer Informationen und biotechnologische Entwicklungen eröffnen der Lebensmittelmikrobiologie und -technologie dabei neue Potentiale.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Charakterisierung der Hitzeschockantwort von *C. jejuni* unter einem milden Hitzestress. Die Anpassung unter milden Stressoren, ohne subletale Schädigung von Zellen, gilt ersten Studien zufolge als wichtiger Faktor in der Ausbildung von Adaptationsmechanismen mikrobieller Lebensmittelinfektionserreger.

Mit Hilfe einer Kompletengenom-Mikroarrayanalyse konnten die einer Hitzeschockantwort (46 °C für 5 min, 10 min und 20 min) zugrunde liegenden globalen Genexpressionsänderungen von *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 erfasst werden.

Die beobachteten globalen Expressionsänderungen waren in hohem Grade transient - in sehr kurzer Zeit reagierten die Zellen mit intensiven Änderungen des Expressionslevels der Gene, nach 20 min blieb jedoch nur ein geringer Teil davon differentiell exprimiert. Gene, welche eine Änderung in ihrer Expression von $\geq 1,5$ bzw. $\leq 1,5$ zeigten, wurden zum einen

anhand der funktioneller Klassifizierung durch das Sanger Institut (2007) in einer vereinfachten Einteilung der Gene nach ihrer Funktion, dargestellt. Diese Auswertungen erlaubten die Beobachtung der zeitlichen Regulation der Adaptation von *C. jejuni* an die veränderte Temperatur von 37 °C auf 46 °C durch die Einteilung in drei verschiedene Phasen der Regulation (akute Phase, Adaptationsphase und *steady-state* Level). Zum anderen konnten die Anteile tatsächlich regulierter Gene im Vergleich zu den generell vorhandenen Genen und die Darstellung und Gruppierung von Genen mit gleicher Änderung der Expression mittels Clusteranalyse ermittelt werden. Ähnliche Expressionsprofile konnten in fünf verschiedenen Gruppen (Clustern) zusammengefasst werden. Somit konnte eine Regulationsstrategie charakterisiert werden. Deutlich wurde, dass der Mikroorganismus unter einem Temperaturstress, welcher seiner physiologischen Wachstumsgrenze entspricht, die Temperaturveränderung unter hohem Energieaufwand und unter starker Induktion von Hitzeschockgenen, sowie einer weiteren Regulation von Genen aus allen untersuchten Funktionsgruppen toleriert. Dass heißt, eine Expressionsdynamik war auf ganzer Genomebene sichtbar. Die Anzahl der regulierten Gene variierte dabei nur geringfügig, jedoch nach 10 min und nach 20 min Temperaturstress wurden mehr Gene differentiell exprimiert, als unmittelbar nach 5 min Inkubation.

Die Chaperone *grpE*, *dnaJ*, *dnaK*, *hrcA*, *groES* und *groEL* gehörten zu den am stärksten induzierten Genen infolge eines Temperaturstresses von 46 °C im Vergleich zu 37 °C im Mikroarray-Experiment.

Die über die Mikroarrayanalyse gewonnenen Resultate wurden durch quantitative PCR-Analysen verifiziert. Die Genexpression 11 ausgewählter Hitzeschockgene (*cbpA*, *clpB*, *dnaJ*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *grpE*, *hrcA*, *hspR*, *htpG*, *tig*), eines RNA-Polymerase-Sigma Faktors (*rpoD*) und eines Stoffwechselmarkers (*sdhA*) wurde mittels Real-time PCR quantifiziert. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Methoden ließ nur eine semiquantitative Beurteilung von Mikroarray-Ergebnissen zu, da kein einheitlicher Faktor ermittelt werden konnte, durch welchen sich die jeweiligen Ergebnisse im Mikroarray- und im Real-Time-Experiment unterscheiden.

Die kodierenden Gene für 16S rRNA und *thiC* wurden für die Evaluierung der Methode auf ihre Stabilität als Haushaltsgene geprüft. Das Stoffwechselgen *thiC* erfüllte die Voraussetzungen der Hitzestabilität und seine ermittelten C_T-Werte lagen im Deduktionsbereich der zu untersuchenden Gene. Nach Primeroptimierung und Effizienzanalyse der Real-time PCR wurden Unterschiede der Expression von Hitzeschockgenen unter verschiedenen Temperaturen (42 °C, 44 °C, 46 °C und 50 °C) und verschiedenen Inkubationszeiten (5 min, 10 min, 20 min, 40 min) untersucht. Durch das Aufzeigen von Expressionen über verschiedene Temperaturbereiche, kombiniert mit verschiedenen Inkubationszeiten, konnte eine Kinetik der Transkription der ausgewählten

Gene aufgezeigt werden. Die Expression des als Stoffwechselmarker untersuchten Gens *sdhA* wurde in allen Temperaturbereichen herunterreguliert, während alle anderen Gene, wie erwartet, unterschiedlich induziert wurden.

Der Nachweis einer sprunghaft angestiegene Induktion der Expression von Hitzeschockgenen bei 42 °C bestärkt die Vermutung von STINTZI (2003), dass diese Temperatur bereits für *C. jejuni* einen Temperaturstress darstellt, obwohl diese Temperatur als optimale Wachstumstemperatur des Mikroorganismus in weiten Bereichen der Wissenschaft gilt.

Unter einem Hitzestress von 46 °C wurden maximale Induktionswerte in der Messung der Genexpression aller Hitzeschockgene, mit Ausnahme der als Negativregulatoren vermuteten Gene *hrcA* und *hspR*, beobachtet. Bei einem Hitzestress von 50 °C war nur noch eine Induktion der Hitzeschockgene *clpB*, *grpE*, *dnaK*, *groEL* und *groES* und des Sigmafaktors *rpoD* messbar. Alle anderen untersuchten Gene wurden herunterreguliert, was die Schlussfolgerung zulässt, dass eine Temperatur von 50 °C eine Änderung der Regulationsstrategie von *C. jejuni* bewirkt. Erste subletale Schädigungen waren fluoreszenzmikroskopisch erkennbar.

Lediglich konnte für die Expression von *dnaJ*, *tig* und *hrcA* ein signifikanter ($p > 0,05$) sowie für *grpE* und *clpB* ein tendenziell signifikanter Einfluss von Temperatur und Zeit beobachtet werden. Alle weiteren untersuchten Gene (*cbpA*, *hspR*, *htpG*, *dnaK*, *groEL*, *groES*) zeigten eine Expression unabhängig von der Dauer des Temperaturstresses bis zu einer Temperatur von 46 °C. Dies erlaubte eine zusammenfassende, vergleichende Beschreibung der Expressionsdynamik von Hitzeschockgenen ohne Berücksichtigung der Zeit. Die Auswertung resultierte in vier verschiedenen Genexpressionsmustern, welche der Induktion der Expression der untersuchten Hitzeschockgene zugeordnet werden konnte.

Campylobacter-Stämme unterscheiden sich sowohl in ihrer Fähigkeit, Stressoren zu überleben, als auch in ihrem Invasions- und Kolonisationsvermögen (PARK, 2005; WASSENAAR et al., 1998). Eine unterschiedliche Regulation der Genexpression unter einem Temperaturstress konnte jedoch zwischen einem human Referenzstamm und aviären Isolaten im Mikroarray-Experiment nicht sichtbar gemacht werden.

Zukünftig müssen weiterhin Regulationsmechanismen von Zellen des Lebensmittelinfektionserregers *C. jejuni* für jede Form von Stress spezifisch untersucht und charakterisiert werden, um Handlungsstrategien zu entwickeln welche Stressoren in der Lebensmittelindustrie optimal kombinieren und somit das Risiko einer Infektion mit *C. jejuni* reduzieren.

Summary

In many temperate countries *Campylobacter* (C.) spp. are the most common bacterial causes of human infectious intestinal disease. A majority of these human campylobacteriosis cases are associated with food of animal origin. *Campylobacter* spp. are very sensitive to environmental stressors, but they are able to persist in the food chain and can pose a treat to the consumer. As a consequence there much that still needs to be understood about the behaviour and pathogenicity of these highly important bacteria. In this dissertation, the stress response to a change in temperature of *C. jejuni in vitro* will be characterized and the importance of food preservation technologies will be discussed. Thereby the availability of genetic information as well as biotechnological developments presents new possibilities to food microbiology und technology. Methods utilized to measure increased transcription mRNA with to code proteins that protect cells against heat stress include microarray-genome-wide expression monitoring (microarray analysis) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

With the help of whole genome microarray analysis it was possible to capture the changes of global gene expressions of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 that form the basis of a heat shock response (46 °C for 5, 10, and 20 min). The observed global expression changes were highly transient – within a very short period of time the cells reacted with intensive changes of the expression level of approx. 25 % of all genes, after 20 min, however, only a very small part there of remained differentially expressed. The findings suggest that the regulation of heat stress response has at least three components: an “acute phase”, an “adaptation phase” and a “steady state level”. The thermal stress response of *C. jejuni* was carried out by the highly induction of the expression of heat shock proteins. However a complete repertoire of genes are either induced or repressed at 46 °C r elative to 37 °C.

The results received through microarray analysis were verified through quantitative PCR analysis (directed to the cDNA of 11 different heat shock genes, individual household genes, metabolic factors and the housekeeping sigma factor *rpoD*). Furthermore, differences in the heat shock response to different temperatures (from 37 °C to 42 °C, 44 °C, 46 °C and 50 °C) were examined and the kinetics of their transcription was shown. Of special interest was the immediately beginning rise of the mRNA-level of individual heat shock genes while other chaperones were activated later and more slowly. So the temperature responsive regulation of heat shock proteins will be demonstrated in the study. Interestingly a heat shock of 46 °C relative to 37 °C was identify in the induction of all heat shock genes as a threshold level – at a heat stress of 50 °C only a small number of heat shock genes are furthermore induced.

7 Literaturverzeichnis

ABEE T und WOUTERS JA (1999)

Microbial stress response in minimal processing. Int J Food Microbiol 50, 65-91

ADAK GK, COWDEN JM, NICHOLAS S und EVANS HS (1995)

The Public Health Laboratory Service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of campylobacter infection. Epidemiol Infect 115, 15-22

AHMED IH, MANNING G, WASSENAAR TM, CAWTHRAW S et al. (2002)

Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials. Microbiology 148, 1203-1212

ALDSWORTH TG, SHARMAN RL und DODD CE (1999)

Bacterial suicide through stress. Cell Mol Life Sci 56, 378-383

ALPERS K, STARK K, HELLENBRAND W und AMMMON A (2004)

Zoonotische Infektionen beim Menschen. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 47, 622-633

ALTEKRUSE SF, STERN NJ, FIELDS PI und SWERDLOW DL (1999)

Campylobacter jejuni - An Emerging Foodborne Pathogen. Emerg Infect Dis 5, 28-35

ALTER T, BORI A, HAMED I, ELLERBROEK L et al. (2006)

Influence of inoculation levels and processing parameters on the survival of *Campylobacter jejuni* in german style fermented turkey sausages. Food Microbiol 23, 701-707

ALTER T, GAULL F, FROEB A und FEHLHABER K (2002)

Verteilung von *Campylobacter jejuni*-Stämmen auf Putenschlachtkörpern an verschiedenen Punkten der Schlachtlinie. 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 202-205

ALTER T und SCHERER K (2006)

Stress response of *campylobacter* spp. and its role in food processing. J Vet Med 53, 351-357

AMMMON A und BRÄUNING J (2002)

Lebensmittelbedingte Erkrankungen in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch Institut (RKI), Nr.01/02, 1-12

ANDERSEN MT, BRONSTED L, PEARSON BM, MULHOLLAND F et al. (2005)

Diverse roles for HspR in *Campylobacter jejuni* revealed by the proteome, transcriptome and phenotypic characterization of an hspR mutant. Microbiology 151, 905-915

ANDERSON W A, HEDGES ND, JONES MV und COLE MB (1991)

Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by differential scanning calorimetry. J Gen Microbiol 137, 1419-1424

ANONYMOUS (2004)

Campylobacter und *Salmonella* -Stand Ende August 2003. Bulletin des Bundesamtes für Gesundheit (Schweiz), Nr.40, 737-740

ANONYMOUS

Campylobacter.

Online: <http://www.nzfsa.govt.nz/science-technology/data-sheets/campylobacter.pdf>
(Stand 9/2003)

ARBEITSGRUPPE LEBENSMITTELQUALITÄT UND –SICHERHEIT

QUASI. Erster Arbeitsbericht (2002) der Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

www.quasi.uni-kiel.de

ARSENE F, TOMOYASU T und BUKAU B (2000)

The heat shock response of *Escherichia coli*. Int J Food Microbiol 55, 3-9

ATANASSOVA V und RING C (1999)

Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany.

Int J Food Microbiol 51, 187-190

BANG DD, NIELSEN EM, SCHEUTZ F, PEDERSEN K et al. (2003)

PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. J Appl Microbiol 94, 1003-1014

BAUMGARTNER A, GRAND M, LINIGER M und SIMMEN A (1995)

Campylobacter contaminations of poultry liver - consequences for food handlers and consumers. Arch Lebensmittelhyg 46, 11-12

BEUTLING D (1998)

Vorkommen und Überleben von *Campylobacter* in Lebensmitteln. Arch Lebensmittelhyg 49, 13-15

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG BfR

Entwicklung von Handlungsoptionen zur Reduzierung von *Campylobacter* spp. im Geflügelbereich – Kurzprotokoll eines Sachverständigen.

Online:http://www.bfr.bund.de/cm/208/entwicklung_von_handlungsoptionen_zur_reduzierung_von_campylobacter_spp_im_gefluegelbereich.pdf (Stand 2006)

BIRK T, INGMER H, ANDERSEN MT, JORGENSEN K et al. (2004)

Chicken juice, a food-based model system suitable to study survival of *Campylobacter jejuni*. Lett Appl Microbiol 38, 66-71

BONNER JJ, CARLSON T, FACKENTHAL DL, PADDOCK D et al. (2000)

Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor. Mol Biol Cell 11, 1739-1751

BOOTH IR (2002)

Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol* 78, 19-30

BRAS AM und KETLEY JM (1999)

Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarised epithelial monolayers. *Fems Microbiol Lett* 179, 209-215

BRAS M, CHATTERJEE MS, WREN BW, NEWELL DG et al. (1999)

A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. *J Bacteriol* 181, 3298-3302

BUSWELL CM, HERLIHY YM, LAWRENCE LM, MCGUIGGAN JT et al. (1998)

Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl Environ Microbiol* 64, 733-741

CATES S (2002)

Changes in consumer knowledge, behavior, and confidence since the 1996 PR/HACCP final rule. Online: http://www.rti.org/pubs/haccp_changes_presentation.pdf (Stand 2008)

CAWTHRAW SA, LIND L, KAIJSER B und NEWELL DG (2000)

Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers. *Clin Exp Immunol* 122, 55-60

CHAKRABARTI S, SENGUPTA N und CHOWDHURY R (1999)

Role of *dnaK* in in vitro and in vivo expression of virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 67, 1025-1033

CHAVEERACH P, KEUZENKAMP DA, URLINGS HA, LIPMAN LJ et al. (2002)

In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry Sci* 81, 621-628

CHAVEERACH P, TER HUURNE AA, LIPMAN LJ und VAN KNAPEN F (2003)

Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Appl Environ Microbiol* 69, 711-714

CHIZHIKOV V, RASOOLY A, CHUMAKOV K und LEVY DD (2001)

Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol* 67, 3258-3263

COGAN TA., BLOOMFIELD SF. und HUMPHREY TJ. (1999)

The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Lett Appl Microbiol* 29, 354-358

COOLS I, UYTENDAELE M, CARO c, D'HAESE E, NELIS HJ, DEBEVERE J

Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *J Appl Microbiol* 94 (5), 886-892

CORRY JE und ATABAY HI (2001)

Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Symp Ser Soc Appl Microbiol 96S-114S

DATTA S, NIWA H und ITOH K (2003)

Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. J Med Microbiol 52, 345-348

DEKEYSER P, GOSSUIN-DETRAIN M, BUTZLER J P und STERNON J (1972)

Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. J Infect Dis 125, 390-392

DICKINS MA, FRANKLIN S, STEFANOVA R, SCHUTZE GE et al. (2002)

Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans as demonstrated by pulsed-field gel electrophoresis. J Food Protect 65, 957-962

DODD C.E., RICHARDS P.J. und ALDSWORTH T.G. (2007)

Suicide through stress: a bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. Int J Food Microbiol 120, 46-50

DORRELL N., CHAMPION O.L. und WREN W. (2002)

Microarray analysis of *Campylobacter jejuni*: to the guts of the problem! Comp Funct Genom 3, 338-341

DORRELL N, MANGAN JA, LAING KG, HINDS J et al. (2001)

Whole Genome Comparison of *Campylobacter jejuni* Human Isolates Using a Low-Cost Microarray Reveals Extensive Genetic Diversity. Genome Res 11, 1706-1715

DUFFY L und DYKES GA

Growth temperature of rour *Campylobacter jejuni* strains influences their subsequent survival in food and water. Lett Appl Microbiol 43, 596-601

ELVERS KT und PARK SF (2002)

Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a luxS encoded signalling molecule. Microbiology 148, 1475-1481

Euzéby JP

List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature LPSN.

Online: <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html> (Stand 2008)

EVANS MR, RIBEIRO CD und SALMON RL (2003)

Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. Emerg Infect Dis 9, 1219-1225

EVANS SJ und SAYERS AR (2000)

A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. Prev Vet Med 46, 209-223

FARKAS J (1998)

Irradiation as a method for decontaminating food. A review. Int J Food Microbiol 44, 189-204

FEHLHABER K

Geflügelfleisch. (XII.2) In: Fehlh Haber K, Kleer J, Kley F (Hsg): Handbuch Lebensmittelhygiene Praxisleitfaden mit wissenschaftlichen Grundlagen. Loseblattausgabe, 4. Aktualisierungslieferung; Behrs Verlag GmbH & Co. KG Hamburg, 2006

FRIEDMAN CR, NEIMANN J, WEGENER HC und TAUXE RV

Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections in the United States and Other Industrialized Nations.

In: Nachamkin I und Blaser MJ (Hrsg): *Campylobacter* ASM Press, Washington, D.C., 2000, 2. Auflage, 121-138

GARENAUX A, JUGIAU F, RAMA F, DE JONGE R, DENIS M et al. (2008)

Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr Microbiol* 56 (4), 293-297

GAYNOR EC, CAWTHRAW S, MANNING G, MACKICHAN JK et al. (2004)

The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinical isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes. *J Bacteriol* 186, 503-517

GILLESPIE IA, O'BRIEN SJ, FROST JA, ADAK GK et al. (2002)

A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Emerg Infect Dis* 8, 937-942

GLÜNDER T, AHLERS C und WEBER R (2000)

Untersuchungen zur Beeinflussung von *Campylobacter*-Infektionen beim Huhn durch organische Säuren und Probiotika im Futter. Springer Verlag 2000, Nr.43, 64-76

GORMAN R, BLOOMFIELD S und ADLEY CC (2002)

A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int J Food Microbiol* 76, 143-150

GRIFFITHS PL, PARK RW und CONNERTON IF (1995)

The gene for *Campylobacter* trigger factor: evidence for multiple transcription start sites and protein products. *Microbiology* 141, 1359-1367

GUILLOU S, LEGUERINEL I, GARREC N, RENARD MA et al. (2008)

Survival of *Campylobacter jejuni* in mineral bottled water according to difference in mineral content: application of the Weibull model. *Water Res* 42, 2213-2219

HALD B und MADSEN M (1997)

Healthy puppies and kittens as carriers of *Campylobacter* spp., with special reference to *Campylobacter upsaliensis*. *J Clin Microbiol* 35, 3351-3352

HARTUNG M (2001)

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2001.

Bundesinstitut für Risikobewertung BfR (Hrsg)

BfR Hausdruckerei Berlin-Dahlem, 2003

HARTUNG M (2007)

Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2005.

Bundesinstitut für Risikobewertung BfR (Hrsg)

BfR-Hausdruckerei Berlin-Dahlem, 2007

HAVELAAR AH, MANGEN MJ, DE KOEIJER AA, BOGAARDT MJ et al. (2007)

Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. Risk Anal 27, 831-844

HAZELEGER WC, JANSE JD, KOENRAAD PM, BEUMER RR et al. (1995)

Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol 61, 2713-2719

HAZELEGER WC, WOUTERS JA, ROMBOUTS FM und ABEE T (1998)

Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. Appl Environ Microbiol 64, 3917-3922

HEUER OE, PEDERSEN K, ANDERSEN JS und MADSEN M (2001)

Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. Lett Appl Microbiol 33, 269-274

HUMPHREY T (1999)

Campylobacter spp: not quite the tender flowers we thought they were? Microbiology Today 29, 7-8

HUMPHREY T (2001)

The spread and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* in the domestic kitchen. J Infect 43, 50-53

HUMPHREY T, O'BRIEN S, MADSEN M (2007)

Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. Int J Food Microbiol 117, 237-257

JACOBS-REIMTSMA W

Campylobacter in the Food Supply.

In: Nachamkin I. und Blaser M.J. (Hrsg): *Campylobacter*

ASM Press, Washington, D.C., 2000, 2. Auflage, 467-481

JAGANNATHAN A, CONSTANTINIDOU C und PENN CW (2001)

Roles of rpoN, fliA, and flgR in expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. J Bacteriol 183, 2937-2942

- JANG KI, KIM MG, HA SD, KIM KS et al. (2007)
Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. J Microbiol Biotechnol 17, 202-206
- JASSON V, UYTENDAELE M, RAJKOVIC A und DEBEVERE J (2007)
Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing. Int J Food Microbiol 118, 241-249
- JENAL U und HENGGE-ARONIS R (2003)
Regulation by proteolysis in bacterial cells. Curr Opin Microbiol 6, 163-172
- JONES K (2001)
Campylobacters in water, sewage and the environment. Symp Ser Soc Appl Microbiol 68S-79S
- JONES M.A., MARSTON K.L., WOODALL C.A., MASKELL D.J. et al. (2004)
Adaptation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 to high-level colonization of the avian gastrointestinal tract. Infect Immun 72, 3769-3776
- JONES PH, WILLIS AT, ROBINSON DA, SKIRROW MB et al. (1981)
Campylobacter enteritis associated with the consumption of free school milk. J Hyg (Lond) 87, 155-162
- KAPPERUD G, ESPELAND G, WAHL E, WALDE A et al. (2003)
Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. Am J Epidemiol 158, 234-242
- KÄRENLAMPI R und HÄNNINEN ML (2004)
Survival of *Campylobacter jejuni* on various fresh produce. Int J Food Microbiol 97, 187-195
- KELLY AF, PARK SF, BOVILL R und MACKEY BM (2001)
Survival of *Campylobacter jejuni* during stationary phase: evidence for the absence of a phenotypic stationary-phase response. Appl Environ Microbiol, Vol. 67, 2248-2254
- KHANNA MR, BHAVSAR SP und KAPADNIS BP (2006)
Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. Lett Appl Microbiol 43, 84-90
- KIST M (2002)
Lebensmittelbedingte Infektionen durch *Campylobacter*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 45, 497-506
- KLANČNIK A, BOTTELDOORN N, HERMANN L, MOŽINA SS (2006)
Survival and stress induced expression of *groEL* and *rpoD* of *Campylobacter jejuni* from different growth phases. Int J Food Microbiol 112, 200-207
- KOBAYASHI K, EHRLICH SD, ALBERTINI A, AMATI G et al. (2003)
Essential *Bacillus subtilis* genes. Proc Natl Acad Sci USA 100, 4678-4683

KONKEL ME, KIM BJ, KLENA JD, YOUNG CR et al. (1998)

Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun 66, 3666-3672

KONKEL ME und TILLY K (2000)

Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. Microbes Infect 2, 157-166

KRAMER JM, FROST JA, BOLTON FJ und WAREING DR (2000)

Campylobacter contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. J Food Protect 63, 1654-1659

KUO WP, LIU F, TRIMARCHI J, PUNZO C et al. (2006)

A sequence-oriented comparison of gene expression measurements across different hybridization-based technologies. Nat Biotechnol 24, 832-840

KUSUMANINGRUM HD, RIBOLDI G, HAZELEGER WC und BEUMER RR (2003)

Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. Int J Food Microbiol 85, 227-236

KUUSI M, NUORTI JP, HANNINEN ML, KOSKELA M et al. (2005)

A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland. Epidemiol Infect 133, 593-601

LAZARO B, CARCAMO J, AUDICANA A, PERALES I et al. (1999)

Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. Appl Environ Microbiol 65, 4677-4681

LEE A, SMITH SC und COLOE PJ (1998)

Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. J Food Protect 61, 1609-1614

LEISTNER L (2000)

Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int J Food Microbiol 55, 181-186

LINDQUIST S (1986)

The heat-shock response. Annu Rev Biochem 55, 1151-1191

LUCCHINI S, THOMPSON A und HINTON JC (2001)

Microarrays for microbiologists. Microbiology 147, 1403-1414

MACKICHAN JK, GAYNOR EC, CHANG C, CAWTHRAW S et al. (2004)

The *Campylobacter jejuni* dccRS two-component system is required for optimal in vivo colonization but is dispensable for in vitro growth. Mol Microbiol 54, 1269-1286

MARCHANT J, WREN B und KETLEY J (2002)

Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. Trends Microbiol 10, 155-159

- MARTIN S, PENTTINEN P, HEDIN G, LJUNGSTROM M et al. (2006)
A case-cohort study to investigate concomitant waterborne outbreaks of *Campylobacter* and gastroenteritis in Soderhamn, Sweden, 2002-3. J Water Health 4, 417-424
- MARTINEZ-RODRIGUEZ A, KELLY AF, PARK SF und MACKEY BM (2004)
Emergence of variants with altered survival properties in stationary phase cultures of *Campylobacter jejuni*. Int J Food Microbiol 90, 321-329
- MATTICK K, DURHAM K, HENDRIX M, SLADER J et al. (2003)
The microbiological quality of washing-up water and the environment in domestic and commercial kitchens. J Appl Microbiol 94, 842-848
- MEAD PS, SLUTSKER L, DIETZ V, MCCAIG LF et al. (1999)
Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 5, 607-625
- MENSONIDES FI, SCHUURMANS JM, TEIXEIRA DE MATTOS MJ, HELLINGWERF KJ et al. (2002)
The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. Mol Biol Rep 29, 103-106
- MEUSBURGER S, REICHART S, KAPFER S, SCHABLEGER K et al. (2007)
Outbreak of acute gastroenteritis of unknown etiology caused by contaminated drinking water in a rural village in Austria, August 2006. Wien Klin Wochenschr 119, 717-721
- MIHALJEVIC RR, SIKIC M, KLANCNIK A, BRUMINI G et al. (2007)
Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. Microb Pathog 43, 120-125
- MOEN B, OUST A, LANGSRUD O, DORRELL N et al. (2005)
Explorative multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions. Appl Environ Microbiol 71, 2086-2094
- MOGK A, TOMOYASU T, GOLOUBINOFF P, RUDIGER S et al. (1999)
Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. Embo J 18, 6934-6949
- MOORHEAD SM und DYKES GA (2002)
Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. Lett Appl Microbiol 34, 72-76
- MURPHY C, CARROLL C und JORDAN KN (2003a)
Identification of a novel stress resistance mechanism in *Campylobacter jejuni*. J Appl Microbiol 95, 704-708
- MURPHY C, CARROLL C und JORDAN KN (2003b)
Induction of an adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiol Lett 223, 89-93

NACHAMKIN I, ALLOS BM und HO T (1998)

Campylobacter species and Guillain-Barre syndrome. Clin Microbiol Rev 11, 555-567

NEIMANN J, ENGBERG J, MOLBAK K und WEGENER HC (2003)

A case-control study of risk factors for sporadic campylobacter infections in Denmark.

Epidemiol Infect 130, 353-366

NEWELL DG (2001)

Animal models of *Campylobacter jejuni* colonization and disease and the lesson to be learned from similar Helicobacter pylori models. J Appl Mikrobiol 90, 57S-67S

NGUYEN HT, CORRY JE und MILES CA (2006)

Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic campylobacters.

Appl Environ Microbiol 72, 908-913

NICHOLSON FA, GROVES SJ und CHAMBERS BJ (2005)

Pathogen survival during livestock manure storage and following land application.

Bioresour Technol 96, 135-143

OBIRI-DANSO K, PAUL N und JONES K (2001)

The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. J Appl Microbiol 90, 256-267

PARK SF

Environmental Regulatory Genes. In: Nachamkin I. und Blaser M.J. (Hrsg): *Campylobacter*.

ASM Press, Washington, D.C., 2000, 2. Auflage, 423-440

PARK SF (2002)

The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. Int J Food Microbiol 74, 177-188

PARK SF

Campylobacter: stress response and resistance. In: Griffiths M (Hrsg): Understanding Pathogen Behaviour. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2005, 279-308

PARKHILL J, WREN BW, MUNGALL K, KETLEY JM et al. (2000)

The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature 403, 665-668

PETERSEN L, LARSEN TS, USSERY DW, ON SL et al. (2003)

RpoD promoters in *Campylobacter jejuni* exhibit a strong periodic signal instead of a -35 box. J Mol Biol 326, 1361-1372

PFAFFL MW (2001)

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29, 2002-2007

QUACKENBUSH J (2006)

Weighing our measures of gene expression. Mol Syst Biol 63, 1-2

REDMOND EC und GRIFFITH CJ (2003)

Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. J Food Protect 66, 130-161

REID AN, PANDEY R, PALYADA K, NAIKARE H et al. (2008)

Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. Appl Environ Microbiol 74, 1583-1597

Robert Koch Institut RKI (Hrsg) (2000)

Zwei Gastroenteritis-Ausbrüche durch *Campylobacter jejuni* nach Genuss von Rohmilch. Epidemiologisches Bulletin, Nr. 18, 143-145

Robert Koch Institut RKI

Jahresstatistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. Online: survstat@rki (Stand 2008)

ROLLINS DM und COLWELL RR (1986)

Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl Environ Microbiol 52, 531-538

ROSENQUIST H, NIELSEN NL, SOMMER HM, NORRUNG B et al. (2003)

Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. Int J Food Microbiol 83, 87-103

SAHIN O, MORISHITA TY und ZHANG Q (2002)

Campylobacter colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. Anim Health Res Rev 3, 95-105

SANGER INSTITUT

C. jejuni Functional Classification. Online: www.sanger.ac.uk (Stand 2007)

SCHINDLER PRG, ELMER-ENGLHARD D und HÖRMANSDORFER S (2003)

Untersuchungen zum mikrobiologischen Status südbayrischer Badegewässer unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens thermophiler *Campylobacter*-Arten. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 46, 483-487

SCHULZ A und SCHUMANN W (1996)

hrcA, the first gene of the *Bacillus subtilis* dnaK operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. J Bacteriol 178, 1088-1093

SEBALD M und VERON M (1963)

Base DNA content and classification of vibrios. Ann Inst Pasteur (Paris) 105, 897-910

SKELLY C und WEINSTEIN P (2003)

Pathogen survival trajectories: an eco-environmental approach to the modeling of human campylobacteriosis ecology. Environ Health Perspect 111, 19-28

SKIRROW MB (1977)

Campylobacter enteritis: a "new" disease. Br Med J 2, 9-11

SNELLING WJ, MATSUDA M, MOORE JE, DOOLEY JSG (2005)

Under the microscope – *Campylobacter jejuni*. Lett Appl. Microbiol 41, 297-302

STEAD D und PARK SF (2000)

Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress. Appl Environ Microbiol 66, 3110-3112

STERN NJ, ROBACH MC, COX NA und MUSGROVE MT (2002)

Effect of drinking water chlorination on *Campylobacter* spp. colonization of broilers.

Avian Dis 46, 401-404

STINTZI A (2003)

Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation.

J Bacteriol 185, 2009-2016

STURN A, QUACKENBUSH J und TRAJANOSKI Z (2002)

Genesis: cluster analysis of microarray data. Bioinformatics 18, 207-208

SUGIMOTO S, SARUWATARI K, HIGASHI C und SONOMOTO K.

The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. Microbiol 154, 1876-1885

TANGWATCHARIN P, CHANTHACHUM S, KHOPAIBOOL P und GRIFFITHS MW (2006)

Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. J Food Protect 69, 2747-2753

TATCHOU-NYAMSI-KONIG JA, MOREAU A, FEDERIGHI M und BLOCK JC (2007)

Behaviour of *Campylobacter jejuni* in experimentally contaminated bottled natural mineral water. J Appl Microbiol 103, 280-288

THIES FL, KARCH H, HARTUNG HP und GIEGERICH G (1999a)

Cloning and expression of the dnaK gene of *Campylobacter jejuni* and antigenicity of heat shock protein 70. Infect Immun 67, 1194-1200

THIES FL, KARCH H, HARTUNG HP und GIEGERICH G (1999b)

The ClpB protein from *Campylobacter jejuni*: molecular characterization of the encoding gene and antigenicity of the recombinant protein. Gene 230, 61-67

THIES FL, WEISHAUP T, KARCH H, HARTUNG HP et al. (1999)

Cloning, sequencing and molecular analysis of the *Campylobacter jejuni* groESL bicistronic operon. Microbiology 145 (Pt 1), 89-98

THOLOZAN JL, CAPPELIER JM, TISSIER J, DELATTRE G et al. (1999)

Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Appl Environ Microbiol 65, 1110-1116

THOMAS C, HILL D und MABEY M (2002)

Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. J Appl Microbiol 92, 433-442

THOMAS C, HILL DJ und MABEY M (1999)

Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. J Appl Microbiol 86, 1024-1032

THURM V und DINGER E (1998)

Lebensmittelbedingte Campylobacterinfektionen-infektionsepidemiologische Aspekte der Ursachenentwicklung, Überwachung und Prävention bei Ausbrüchen durch *Campylobacter jejuni*. InfFO II / 98, 6-10

TOLKER-NIELSEN T und MOLIN S (1996)

Role of ribosome degradation in the death of heat-stressed *Salmonella typhimurium*. Fems Microbiol Lett 142, 155-160

VAN DE GIESSEN AW, TILBURG JJ, RITMEESTER WS und VAN DER PJ (1998)

Reduction of campylobacter infections in broiler flocks by application of hygiene measures. Epidemiol Infect 121, 57-66

VAN VLIET AH und KETLEY JM (2001)

Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. Symp Ser Soc Appl Microbiol 45S-56S

VAN DER VEEN S, HAIN T, WOUTERS JA, HOSSAIN H et al. (2007a)

The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. Microbiology 153, 3593-3607

VANBOGELEN RA und NEIDHARDT FC (1990)

Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 87, 5589-5593

VANDAMME P und GOOSSENS H (1992)

Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: a review. Zentralbl Bakteriol 276, 447-472

VANDECASTEELE SJ, PEETERMANS WE, MERCKX R und VAN ELDERE J (2001)

Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. J Bacteriol 183, 7094-7101

VOGT RL, SOURS HE, BARRETT T, FELDMAN RA et al. (1982)

Campylobacter enteritis associated with contaminated water. Ann Intern Med 96, 292-296

WAGENAAR JA, VAN BERGEN MA, MUELLER MA, WASSENAAR TM et al. (2005)

Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol 109, 275-283

WAGNER M

Harmonsierung und Standardisierung in der molekularen Lebensmittelhygiene. Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten Jahrestagung Wolfpassing, 2001

WASSENAAR TM (1997)

Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin Microbiol Rev 10, 466-476

WASSENAAR TM und GAASTRA W (2001)

Bacterial virulence: can we draw the line? Fems Microbiol Lett 201, 1-7

WASSENAAR TM, GEILHAUSEN B und NEWELL DG (1998)

Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. Appl Environ Microbiol 64, 1816-1821

WOSTEN MM, BOEVE M, GAASTRA W und VAN DER ZEIJST BA (1998)

Cloning and characterization of the gene encoding the primary sigma-factor of *Campylobacter jejuni*. Fems Microbiol Lett 162, 97-103

WURMBACH E, YUEN T, EBERSOLE BJ und SEALFON SC (2001)

Gonadotropin-releasing hormone receptor-coupled gene network organization. J Biol Chem 276, 47195-47201

YANG H, LI Y und JOHNSON MG (2001)

Survival and death of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling. J Food Prot 64, 770-776

YOUSEF AE und COURTNEY PD

Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods. In: YOUSEF AE und JUNEJA VK (Hrsg): Microbial Stress Adaptation and Food Safety. CRC Press LLC, Boca Raton, London, Washington, D.C., 2003

ZHAO C, GE B, DE VILLENA J, SUDLER R et al. (2001)

Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. Appl Environ Microbiol 67, 5431-5436

ZHAO T, EZEIKE GO, DOYLE MP, HUNG YC et al. (2003)

Reduction of *Campylobacter jejuni* on poultry by low-temperature treatment. J Food Protect 66, 652-655

8 Anhang

Verzeichnis:

A)

- I. Funktionelle Klassifizierung von *C. jejuni* (Tabelle 14)

B)

- II. Rohdaten *C. jejuni* NCTC 11168*
- III. Rohdaten weiterer *C. jejuni*-Stämme*
- IV. Globale Genexpressionsanalyse von *C. jejuni* NCTC 11168*
- V. Globale Genexpressionsanalyse weiterer *C. jejuni*-Stämme*
- VI. Zusammenfassung der Ergebnisse der relativen Quantifizierung mittels Real-time PCR

* Aufgrund des großen Datenumfangs sind diese Daten auf einer der Dissertation beiliegenden CD gespeichert.

Tabelle 14: Funktionelle Klassifizierung von *C. jejuni* modifiziert nach dem Sanger Institut

Gruppe	Bezeichnung	Funktionelle Untereinheiten [Anzahl der Gene]
1	Degradation	Carbon compounds [5] Amino acids [3]
2	Energiemetabolismus	Glycolysis [9] Tricarboxylic acid cycle [13] Non oxidative branch [3] Respiration [11] Aerobic [14] Anerobic [4] Electron transport [44]
3	Zentraler Metabolismus	General [18] Gluconeogenesis [5] Sugar nucleotides [2] Amino sugars [1] Sulphur metabolism [4]
4	Aminosäure-Biosynthese	Glutamat family [10] Aspartat family [17] Serine family [6] Aromatic amino acid Family Histidine [8] Branched chain family [10]
5	Purine, Pyrimidine, Nukleotide, Nukleoside	Polyamine synthesis [1] Purine ribonucleotide biosynthesis [19] Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis [9] 2'-deoxyribonucleotide biosynthesis [5] Salvage of nucleosides and nucleotides [4] Miscellaneous nucleoside/nucleotide reactions [3]
6	Biosynthese von Co-Faktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern	Biotin [6] Thioredoxin [2] Menaquinone and ubiquinin [4] Heme [8] Folic acid [8] Molybdopterin [9] Pantothenate [6] Pyridoxine [4] Pyridine nucleotide [1] Thiamine [10] Riboflavin [6]
7	Fettsäuresynthese	Fatty acid biosynthesis [21]

Gruppe	Bezeichnung	Untereinheiten [Anzahl der Gene]
8	Regulatorische Funktionen	Broad regulatory functions [28]
9	Signaltransduktion	Signal transduction [26]
10	Synthese und Modifikation von Makromolekülen	Phospholipids [8] Ribosomal protein synthesis and modification [54] Ribosome maturation and modification [6] Aminoacetyl tRNA synthetases and their modification [40] Nucleoproteins [1] DNA replication, restriction/modification, recombination and repair [62] Protein translation and modification [27] RNA synthesis, RNA modification and DNA transcription [18]
11	Degradierung von Makromolekülen	DNA [3] Proteins, peptides and glycopeptides [23]
12	Zellentwicklung	Membranes, lipoproteins and porins [137] Surface polysaccharides, lipopolysaccharides and antigens [70] Surface structures [47] Murein sacculus and peptidoglycan [17] Miscellaneous periplasmatic proteins [100]
13	Zellprozesse/ Transport	Amino acids and amine [21] Cations [41] Carbohydrates, organic acids and alcohols [10] Anions [10] Other [74]
14	Chaperone	Chaperones, chaperonins, heat shock [17]
15	Zellprozesse/ Andere	Cell division [9] Chemotaxis and mobility [9] Protein and peptide secretion [20] Detoxification [7] Pathogenicity [15]
16	Andere	IS elements [1] Plasmid related functions [1] Drug/analogue sensitivity [9] Adaptions and atypical conditions [2] Conserved hypothetical proteins [125] Unbekannt [117]
17	Unbekannt	Misc [152]

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Leipzig, den 03.12.2008

Lebenslauf

Name: Annekathrin Froeb-Borgwardt, geb. Froeb

Geburtsdatum: 11.03.1975

Geburtsort: Lobenstein

Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

Schul Ausbildung: Salzmann-Gymnasium Schnepfenthal (Thüringen), Abschluß Abitur

Studium: 1993-1999 Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich Schiller Universität Jena

Diplomarbeit: Ermittlung der antioxidativen Aktivität mit TEAC- und TRAP-Test – ein kritischer Vergleich

Abschluss: Diplom Ernährungswissenschaftlerin

Berufliche Tätigkeit: Seit Mai 2001 am Institut für Lebensmittelhygiene im molekularbiologischen und chemischen Labor beschäftigt.

Danksagung

Nicht nur für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig und die zur Verfügung gestellten Arbeitsmaterialien, sondern auch für sein großes Interesse an dem Fortgang der Arbeit möchte ich Prof. Dr. Dr. h.c. K. Fehlhaber herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thomas Alter für seine wertvollen Ratschläge und die jederzeit gewährte konstruktive Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. W. Dorn für die mir jederzeit gewährte, stets freundliche Hilfe danken.